



<p>(51) 国際特許分類6 A61K 31/12, 31/215, 31/34, 35/78</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/29111</p> <p>(43) 国際公開日 1998年7月9日(09.07.98)</p>														
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/04765</p> <p>(22) 国際出願日 1997年12月24日(24.12.97)</p> <p>(30) 優先権データ</p> <table border="0"> <tr> <td>特願平8/357313</td> <td>1996年12月25日(25.12.96)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平9/23344</td> <td>1997年1月21日(21.01.97)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平9/279885</td> <td>1997年9月25日(25.09.97)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平9/279886</td> <td>1997年9月25日(25.09.97)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平9/329594</td> <td>1997年11月12日(12.11.97)</td> <td>JP</td> </tr> </table> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 有限会社 デザイナーフーズ協会 (DESIGNER FOODS ASSOCIATION LTD.)(JP/JP) 〒540-0019 大阪府大阪市中央区和泉町2丁目2番14号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 眞岡孝至(MAOKA, Takashi)(JP/JP) 〒520-33 滋賀県甲賀郡甲南町大字磯尾455番地 Shiga, (JP) 持田晃一(MOCHIDA, Kooichi)(JP/JP) 〒572 大阪府寝屋川市東香里園町8番10号 Osaka, (JP) 小塚睦夫(KOZUKA, Mutsuo)(JP/JP) 〒602 京都府京都市上京区上御盤中町458番地 Kyoto, (JP) 徳田春邦(TOKUDA, Harukuni)(JP/JP) 〒606 京都府京都市左京区下鴨北園町3番地 Kyoto, (JP)</p>	特願平8/357313	1996年12月25日(25.12.96)	JP	特願平9/23344	1997年1月21日(21.01.97)	JP	特願平9/279885	1997年9月25日(25.09.97)	JP	特願平9/279886	1997年9月25日(25.09.97)	JP	特願平9/329594	1997年11月12日(12.11.97)	JP	<p>伊藤義博(ITO, Yoshihiro)(JP/JP) 〒603 京都府京都市北区大宮南山ノ前町40番地1-401 Kyoto, (JP)</p> <p>奥田素子(OKUDA, Yoko)(JP/JP) 〒669 兵庫県宝塚市伊子志2丁目9番9号 Hyogo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 宮崎伊章(MIYAZAKI, Tadaaki) 〒564 大阪府吹田市江坂町1丁目23番43号 ファサード江坂ビル Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書 補正書・説明書</p>
特願平8/357313	1996年12月25日(25.12.96)	JP														
特願平9/23344	1997年1月21日(21.01.97)	JP														
特願平9/279885	1997年9月25日(25.09.97)	JP														
特願平9/279886	1997年9月25日(25.09.97)	JP														
特願平9/329594	1997年11月12日(12.11.97)	JP														
<p>(54)Title: CARCINOGENESIS INHIBITORS</p> <p>(54)発明の名称 発癌抑制剤</p> <p>(57) Abstract Carcinogenesis inhibitors containing as the active ingredient carotenoids extracted from the pure-line species of paradiosom paprika (species classified as <i>Capsicum annum L. var. grossum</i> ), etc., such as capsanthin, its fatty acid esters, capsorubin diesters, capsanthin 3,6-epoxide, capsorubin and cucurbitaxanthine A-3' ester. These carcinogenesis inhibitors and paradiosom paprika extracts originate in natural substances and, therefore, make it possible to provide excellent Epstein-Barr virus genome inactivating agents. Thus, they are expected as being useful in preventing carcinogenesis and, based on their effects, applicable in various fields including drugs, cosmetics and health foods.</p>																

(57) 要約

パラディチヨムパブリカ (paradicsom paprika) の純系種 (学名 Capsicum annuum L. var. grossum に分類される品種) のエキスなどから抽出されたカプサンチン、カプサンチンの脂肪酸エステル、カプソルビンジエステル、カプサンチン 3, 6-エポキシド、カプソルビン、ククルビタキサンチン A-3' エステルなどのカロテノイドを有効成分とする発癌抑制剤である。本発明の発癌抑制剤及びパラディチヨムパブリカのエキスは天然由来ものであり、優れた抗エプスタイン-バーウイルス・ゲノム不活性剤を提供することができる。したがって、本発明は発癌予防効果が期待でき、それらの作用から医薬品、化粧品、健康食品の各分野に応じ、多岐にわたる利用が可能となる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AT	オーストリア	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	TD	チャド
AU	オーストラリア	GE	グルジア	MC	モナコ	TG	トーゴ
AZ	アゼルバイジャン	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BB	バルバドス	GM	ガンビア	MK	マケドニア共和国	TR	トルコ
BE	ベルギー	GW	ギニア・ビサウ		ラヴィア	TT	トリニダード・トバゴ
BG	ブルキナ・ファソ	GR	ギリシャ	ML	マリ	UG	ウガンダ
BJ	ブルガリア	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MR	モリタニア	US	米国
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CA	カナダ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ベトナム
CC	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	WU	ウイグル
CG	コンゴ共和国	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラヴィア
CH	スイス	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CI	コートジボワール	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CM	カメルーン	KG	キルギス	PL	ポーランド		
CN	中国	KR	韓国	PT	ポルトガル		
CU	キューバ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CC	キプロス	KZ	カザフスタン	RU	ロシア		
CZ	チェコ	LC	セント・ルシア	SD	スーダン		
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン		
DK	デンマーク	LR	リベリア	SG	シンガポール		
EE	エストニア	LS	レソト	SK	スロバキア		
ES	スペイン			SL	シエラ・レオネ		

## 明細書

## 発癌抑制剤

## 技術分野

- 5 本発明は、発癌抑制剤に関し、さらに詳述すれば、発癌を抑制する植物エキス、及びそれらの植物エキスから得られるカロテノイド物質を有効成分とした発癌化抑制作用を有する発癌抑制剤に関する。

## 背景技術

- 10 日本人の死亡原因の第1位は癌であり、発癌予防は国民の健康上極めて重要な問題になっている。一般に癌はイニシエーションとプロモーションとの異なった二段階を経て起こると考えられている。すなわち、紫外線、放射線や変異原物質などのイニシエーターによって、正常細胞の遺伝子のDNAに修復できない損傷が起こり（イニシエーション）、その結果生じた潜在的な癌細胞が、プロモーターと呼ばれる  
15 化学物質によって繰り返し刺激され（プロモーション）癌化する。したがってイニシエーションまたはプロモーションのいずれかの過程を阻止することにより癌を防ぐことができる。

- 20 しかし、環境中にはイニシエーターとなる紫外線、放射線や種々の変異原物質が存在するため、イニシエーターを完全に除去することは不可能である。また、大部分の成人はイニシエーションにかかった細胞を既に保有していると考えられており、イニシエーション過程の阻害は発癌予防の観点から有効とはいえない。一方、プロモーション過程は長期にわたるので、この過程を阻害することが有効な発癌の予防方法であると考えられる。

以上の観点から、抗発癌プロモーターを探索する試みが行われ、多くの植物エキス及びその成分などが抗発癌プロモーターとして作用することが報告されているが、さらなる発癌抑制作用をもつ食用植物を起源とする安全な植物エキスの提供が望まれている。

5       この様な背景から、黄柏など多くの植物の粗抽出物が実験的発癌の抑制を可能とする例が報告されており、また、その有効主成分が $\beta$ -カロテンであることが判明するなど、徐々にその内容が明らかにされつつある。

10       抗発癌プロモーターの一次スクリーニング試験法としては、エプスタイン-バー ル ウイルス・ゲノム活性化抑制試験法がある。この試験法はエプスタイン-バー ル ウイルス・ゲノムを内蔵するパーキッ ト・リンパ種由来の培養細胞であるラジ (R a j i) 細胞の培養系においてテトラデカノイルホルボールアセテート (以下、T P Aと略記する。) をプロモーターとするウイルスゲノムの発現抑制を指標とするものである。この方法は迅速かつ定量性があり、加えて微量で活性物質の検出が可能である。

15       エプスタイン-バー ル ウイルスは、ヘルペスウイルス科のウイルスで、パーキッ トリンパ種や上咽頭癌の原因とされている。該ウイルスは、これらの癌患者のみに検出されるのではなく、世界中に極めて  
20       広く潜在し、人の普遍的なウイルスであり、ほとんどすべての成人はエプスタイン-バー ル ウイルスに感染しているといわれている。エプスタイン-バー ル ウイルスは、人の正常Bリンパ球を感染標的として芽球化し、これに無限の増殖能を付与することが明らかになっており、Bリンパ球への腫瘍原生を内蔵する人の常在性ウイルス因子と  
25       規定されている。

本発明の課題は、発癌抑制作用を有する新規な発癌抑制剤を提供す

る点にある。

#### 発明の開示

発明者はエプスタインーバー ル ウイルス・ゲノム活性化抑制作用  
5 を指標に、数多くの微生物、植物を対象として系統的な研究・実験を  
重ねた結果、パラディチヨムパブリカから抽出されるエキス、及びそ  
のエキスに含まれるカロテノイドであるカプサンチン、カプサンチン  
の脂肪酸エステル、カプソルビンジエステル、カプサンチン 3， 6 -  
エポキシド、カプソルビン、ククルビタキサンチン A - 3' エステル  
10 が強いエプスタインーバー ル ウイルス・ゲノム活性化抑制作用を有  
するという剋目すべき知見を得、本発明を完成した。

また、本発明者は、カプサンチン脂肪酸エステルの構造を検討した  
結果、カプサンチンの脂肪酸モノエステルのほか、特にカプサンチン  
の脂肪酸ジエステルがより一層強いエプスタインーバー ル ウイルス  
15 ・ゲノム活性化抑制作用を有する知見を得た。

さらに、カプサンチン、カプソルビン、ククルビタキサンチンの脂  
肪酸エステルについて、エプスタインーバー ル ウイルス・ゲノム活  
性化抑制作用を詳細に研究した結果、パルチミン酸エステル、ラウリ  
ン酸エステル、ミリスチン酸のエステルが抗癌ウイルス活性化抑制作  
20 用を発揮することを見いだした。

上記の有効成分を多く含む植物として本発明者が見出したものにパ  
ラディチヨムパブリカの果実が挙げられる。パラディチヨムパブリカ  
(paradicsom paprika) は、ハンガリーを原産とする野菜である。そ  
の原種の実はクローバ型で、深い赤色であり、表面は光沢がありロウ  
25 質で、加熱しても色が抜けない性質を有している。また、果肉が厚く  
、糖度が高く、青臭さが無い。また、その成分分析例としては、可食

部 1 0 0 g 当りビタミンA効力 (IU) が 7 8 0、ビタミンB<sub>2</sub>が 0  
・ 2 3 m g、ビタミンCが 1 8 9 m g、鉄が 0 . 6 2 m gである。本  
発明でいうパラディチヨムパプリカ (paradicsom paprika) は、この  
原種パラディチヨムパプリカを意味するが、さらに本発明ではこの原  
5 種の中のうち特定の果実をつけるものの選抜を繰り返し行いこれを固  
定し、稔実の確かさを向上させた品種 (以下、純系種という。) をも  
含めて定義づけられる。なお、純系種は、分類学による学名 *Capsicu*  
*m annuum* L. var. *grossum* に分類されている。例えば、日本国の市場に  
10 において「トマピー」という商標名で取り引きされていものが含まれる  
。また、かかる純系種のパラディチヨムパプリカにラージベルタイプ  
、ピメント系タイプ、ハンガリアンパプリカタイプ、ラージネアポリ  
タン系タイプのいずれかのピーマンを交配させた種 (以下、F 1 種と  
いう。) 及び F 1 種同志の交配による種 (以下、四元交配種という。  
) 及びこれらの交配種のとりもどし種 (以下、F 2 種という。) をも  
15 含めて定義される。すなわち、本発明でいうパラディチヨムパプリカ  
とは、原種のほか、純系種、および、F 1 種、四元交配種、F 2 種並  
びにそれ以降の交配種のパラディチヨムパプリカを意味する。

本発明の発癌抑制剤の有効成分であるカプサンチン、カプサンチン  
の脂肪酸エステル、カプソルビンジエステル、カプサンチン 3 , 6 -  
20 エポキシド、カプソルビン、ククルビタキサンチン A - 3 ' エステル  
のカロテノイドはそれぞれ、いわゆる赤ピーマンなどの *Capsicum* 属の  
植物の果実から分離することができる。中でもパラディチヨムパプリ  
カ (paradicsom paprika) にはこれらのカロテノイドが多量に含まれ  
ており、これから分離したものが好適に使用することができる。本発  
25 明においてはパラディチヨムパプリカをアセトン等で抽出したエキス  
に含まれるカプサンチン、カプサンチンの脂肪酸エステル、カプソル

ビンジエステル、カプサンチン 3, 6-エポキシド、カプソルビン、  
ククルビタキサンチン A-3' エステルが好ましい。但し、これから  
抽出されたものに限定されるものではなく、赤ピーマンの果実など他  
の植物から抽出されたものであっても、合成品であって何問題は  
5 ない。また抽出方法は特に限定されるものではなく、抽出溶媒も他の  
ものを用いてもよい。

また、カプサンチンの脂肪酸エステル、カプソルビンジエステル、  
ククルビタキサンチン A-3' エステルを構成する脂肪酸としては少  
なくともパルミチン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸であることが判明  
10 した。

カプサンチン、カプサンチンの脂肪酸エステル、カプソルビンジエ  
ステル、カプサンチン 3, 6-エポキシド、カプソルビン、ククルビ  
タキサンチン A-3' エステルは強い発癌ウイルス活性化阻害作用を  
示した。したがって、これらのカロテノイドはエプスタイン-バー  
15 ウイルス・ゲノムの発現を阻害することから、発癌予防効果を奏す  
る。よって、これらは癌予防の観点から、医薬品、化粧品、健康食品  
等の分野に広く利用できる。

#### 図面の簡単な説明

20 第 1 図は、パラディチヨムパブリカのエキスを使用したマウス皮膚  
2 段階発癌抑制試験における実験開始後の経過週とパピローマ発生マ  
ウスの割合の関係を示すグラフである。

第 2 図は、パラディチヨムパブリカのエキスを使用したマウス皮膚  
2 段階発癌抑制試験における実験開始後の経過週と発生したパピロー  
25 マ数の関係を示すグラフである。

第 3 図は、カプソルビンジエステルの  $^1\text{H-NMR}$  のチャートであ

る。

第 4 図は、カブソルビンジエステルの  $^{13}\text{C}-\text{NMR}$  のチャートである。

5 第 5 図は、カブソルビンジエステルの  $\text{UV}-\text{VIS}$  のチャートである。

第 6 図は、カブソルビンジエステルの  $\text{FAB}-\text{MS}$  のチャートである。

第 7 図は、カブサンチンジエステルの  $^1\text{H}-\text{NMR}$  のチャートである。

10 第 8 図は、カブサンチンジエステルの  $^{13}\text{C}-\text{NMR}$  のチャートである。

第 9 図は、カブサンチンジエステルの  $\text{UV}-\text{VIS}$  のチャートである。

15 第 10 図は、カブサンチンジエステルの  $\text{FAB}-\text{MS}$  のチャートである。

第 11 図は、ククルビタキサンチンの  $^1\text{H}-\text{NMR}$  のチャートである。

第 12 図は、ククルビタキサンチンの  $\text{UV}-\text{VIS}$  のチャートである。

20 第 13 図は、ククルビタキサンチンの  $\text{FAB}-\text{MS}$  のチャートである。

第 14 図は、カブサンチン 3, 6-エポキシドの  $^1\text{H}-\text{NMR}$  のチャートである。

25 第 15 図は、カブサンチン 3, 6-エポキシドの  $^{13}\text{C}-\text{NMR}$  のチャートである。

第 16 図は、カブサンチン 3, 6-エポキシドの  $\text{UV}-\text{VIS}$  のチ



ャートである。

第 17 図は、カプサンチン 3, 6-エポキシドの FAB-MS のチャートである。

第 18 図は、カプソルピンの  $^1\text{H-NMR}$  のチャートである。

5 第 19 図は、カプソルピンの UV-VIS のチャートである。

第 20 図は、カプソルピンの FAB-MS のチャートである。

第 21 図は、カプサンチンモノエステルの  $^1\text{H-NMR}$  のチャートである。

10 第 22 図は、カプサンチンモノエステルの  $^{13}\text{C-NMR}$  のチャートである。

第 23 図は、カプサンチンモノエステルの UV-VIS のチャートである。

第 24 図は、カプサンチンモノエステルの FAB-MS のチャートである。

15 第 25 図は、カプサンチンの  $^1\text{H-NMR}$  のチャートである。

第 26 図は、カプサンチンの  $^{13}\text{C-NMR}$  のチャートである。

第 27 図は、カプサンチンの UV-VIS のチャートである。

第 28 図は、カプサンチンの FAB-MS のチャートである。

20 第 29 図は、カプサンチン等を使用したマウス皮膚 2 段階発癌抑制試験における実験開始後の経過週とパピローマ発生マウスの割合の関係を示すグラフである。

第 30 図は、カプサンチンなどを使用したマウス皮膚 2 段階発癌抑制試験における実験開始後の経過週発生したパピローマ数の関係を示すグラフである。

25

発明を実施するための最良の形態

## 実施形態 1

本発明のパラディチヨムパブリカエキスは次のような手順により抽出される。本実施例の抽出には、前述の純系種（学名 *Capsicum annuum* L.var.grossumに分類される品種）を用いた。すなわち、パラディチヨムパブリカの可食部 1 k g を裁断し、アセトンに浸漬して室温で暗所に静止し、時々振蕩して赤色のアセトン抽出物を得た。抽出残渣に再びアセトンを加えて同じ操作をさらに 3 回繰り返してアセトン抽出液を集めた。この抽出液を減圧濃縮乾固しアセトンエキスを得た。また、抽出溶媒にメタノールを用い、この方法と同様にしてメタノールエキスを作成した。これらにヘキサンを加えてとかし、ヘキサンに可溶の区分を集めヘキサン抽出物を得た。これを減圧濃縮してヘキサン抽出物を得た。

（エプスタインーバー ル ウイルス・ゲノムの発現阻害活性の測定）

このアセトン抽出物、及びヘキサン抽出物を用い、エプスタインーバー ル ウイルス・ゲノムの発現阻害活性の測定を次の条件で行った。エプスタインーバー ル ウイルス潜在感染ヒトリンパ芽球細胞株、ラジ細胞の培養液として P R M I 1 6 4 0 に胎仔血清及び抗生物質を加えたものを使用した。この培養条件下で、エプスタインーバー ル ウイルス早期抗原の自然発生率は 0. 1 % 以下である。  $1 \times 10^6$  細胞 / m l の濃度に調整したラジ細胞を、4 m M の n - 酪酸、2 0 n g / m l の T P A、それに 1 0 0  $\mu$  g / m l の被検物質を加えた上記培養液中で 3 7  $^{\circ}$  C、4 8 時間培養した、上咽頭癌患者血清を用いた間接蛍光抗体法にてエプスタインーバー ル ウイルス早期抗原を発現した細胞を検出し、陽性細胞の比率を被検物質を加えなかったコントロールに対して算出し、ウイルス・ゲノムの発現阻害活性とした。さらに

被検物質の濃度を  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  に変化させて同活性を測定した。この結果を表 1 に示す。

濃度 ( $\mu\text{g}/\text{TPA}$ )	100	10	1
パプリカアセトンエキス	100 (70)	71.0 (>80)	8.2 (>80)
パプリカヘキサンエキス	100 (70)	56.3 (>80)	0 (>80)
黄柏エキス	100 (70)	72.4 (>80)	15.1 (>80)

単位 %抑制率 (%ラジ細胞生存率)

上記表 1 より、パラディチヨムパプリカをアセトンで抽出したエキス及びそのエキスをヘキサンで抽出した抽出物は強い発癌ウイルス活性化阻害作用を示した。その阻害作用は医薬品として用いられている黄柏エキスとほぼ同様の作用を有しており、発癌性ウイルス活性抑制剤としての価値が認められた。また、ラジ細胞生存率も 70% 以上を維持しており、細胞に対する毒性はほとんど認められないことが判明した。従ってパラディチヨムパプリカのエキス及び抽出物は発癌抑制作用を有し、発癌抑制剤の有効成分とすることができることが見出された。

#### (マウス皮膚二段階発癌抑制試験)

上記のようにパラディチヨムパプリカの抽出物は強い発癌ウイルス活性化抑制作用を示すことが確認することができた。そこで、発癌抑制効果を明確にするため、マウスを用いる皮膚癌の抑制試験を行った。すなわち、マウス皮膚二段階発癌抑制試験を次の条件で行った。

1 群 15 匹の ICR 雌性マウス (6 週齢) の背部体毛を剃毛して 24 時間後、背部皮膚にアセトン ( $0.1 \text{ ml}$ ) に溶解した 7, 12-

ジメチルベンズ [ $\alpha$ ] アントラセン (以下、DMBAと略記する。) (100  $\mu$ g, 390 nmol) を塗布してイニシエーションを行い、一週間後から各実験群を以下のように処理した。

5 第1群: アセトン (0.1 ml) に溶解したTPA (1  $\mu$ g, 1.7 nmol) を週2回、20週間塗布し続けることによりプロモーションを行う。この際、TPA塗布1時間前にアセトン (0.1 ml) を同部位に塗布する (陽性コントロール群)。

10 第2群: 第1群と同様に、週2回、20週間にわたりTPA (1  $\mu$ g, 1.7 nmol) 塗布1時間前にアセトン (0.1 ml) に溶解した被検試料パラディチヨムパブリカエキス (メタノールで抽出したもの) 50  $\mu$ g を塗布する。

15 TPA塗布によるプロモーション開始20週後まで、各週ごとにマウス背部に発生するパピローマを観察し、パピローマの発生したマウスの率と1匹あたりに発生したパピローマの平均個数とを陽性コントロール群と比較して評価した。その結果を第1図及び第2図に示す。

20 試験の結果、第1図に示すように陽性コントロール群ではプロモーション開始後7週目に最初の腫瘍が形成され、11週目にはすべてのマウスに腫瘍が形成されたのに対し、第2群 (メタノールエキス処理群) ではいずれも9週目にはじめて腫瘍の形成が認められ、腫瘍の形成を遅延させることが明らかとなった。また、試験終了時の20週後においても、第2群では20%のマウスには腫瘍形成が認められなかった。

25 また、第2図から明らかなように、マウス1匹あたりの平均腫瘍個数は20週後で陽性コントロール群では9.1個であったのに対し、第2群では4.5個であり、50%の発癌抑制効果が認められた。

このことから、パラディチヨムパブリカの抽出物は、マウス皮膚二

段階発癌抑制試験においても発癌抑制作用を有することが見出された。  
。

## 実施形態 2

5       上記のようにパラディチヨムパプリカのエキ스는生体試験においても発癌ウイルス活性化抑制作用をはじめ、発癌抑制作用を発揮することが認められた。そこで本発明者はかかるエキ스에含まれる有効成分を明らかにするためにさらに次の試験を行った。

10       本発明の発癌抑制剤の有効成分であるカロテノイドは一例として、次のようなパラディチヨムパプリカエキ스의分画により次の手順で抽出、分離される。

15       本試験においては、前述のパラディチヨムパプリカ (paradicsom paprika) の純系種 (学名 *Capsicum annuum* L. var. *grossum* に分類される品種) を用いた。すなわち、パラディチヨムパプリカの可食部 800 g を裁断し、アセトンに浸漬して室温で暗所に静置し、時々振蕩して赤色のアセトン抽出液を得た。抽出残渣に再びアセトンを加えて同じ操作をさらに 3 回繰り返してアセトン抽出液を集めた。この抽出液を減圧濃縮乾固しアセトンエキ스를得た。これにヘキサンを加えて溶かし、ヘキサンに可溶の区分を集めヘキサン抽出物を得た。これ  
20       を減圧濃縮してヘキサン抽出物を得た。

25       さらにこのエキ스를定量した結果、パラディチヨムパプリカの可食部 800 g から 120 mg のカロテノイドを抽出物として取り出すことができることが判明した。これらの成分を分析するため、ヘキサンエキ스를シリカゲルを吸着剤とするカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン-エーテル (7 : 3) で溶出したフラクションにより A 成分 (カプソルビンジエステル) を 20 mg、ヘキサン-エーテル (8

：2)で溶出したフラクションによりB成分(カプサンチンの脂肪酸ジエステル)を40mg、エーテルで溶出したフラクションによりC成分(ククルピタキサンチン)を8mg、エーテル-アセトン(9:1)で溶出したフラクションによりD成分(カプサンチンエポキシド)  
5)を8mg、エーテル-アセトン(7:3)で溶出したフラクションによりE成分(カブソルビン)を5mg、ヘキサン-エーテル(5:5)で溶出したフラクションによりF成分(カプサンチンの脂肪酸モノエステル)を24mg、エーテル-アセトン(8:2)で溶出したフラクションによりG成分(カプサンチン)を12mgを分離した。  
10)。

これらの分画されたA~G成分の物質を明らかにするため、各成分について必要に応じて紫外-可視部吸収スペクトル(以下、UV-VISと略記する。)、高速原子衝撃質量分析スペクトル(以下、FAB-MSと略記する。)、水素核磁気共鳴スペクトル(以下、<sup>1</sup>H-NMRと略記する。)、及び炭素核磁気共鳴スペクトル(以下、<sup>13</sup>C-NMRと略記する。)を用いてその物質が何であるかの検討を行った。  
15)。

#### (A成分の解析)

20) 上記分析の結果、A成分はカブソルビンジエステルであることが判明した。なお、本実施形態においては上述のようにパラディチヨムバプリカのエキスから抽出したものであり、かかる場合のその脂肪酸の種類と構成比は表2のものであることが判明した。そのスペクトルデータは次の通りである。

25) UV-VIS (ether)  $\lambda$ : 445, 479, 510, nm, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.86 (6H, s, H-16, 16

' ), 0.88 (6H, t,  $J=7$  Hz, CH<sub>3</sub> fatty acid), 1.18 (6H, s, H-17, 17'), 1.25 (s, CH<sub>2</sub> fatty acid), 1.32 (6H, s, H-18, 18'), 1.57 (2H, dd,  $J=15$ , 3.5 Hz, H-4 $\beta$ , 4' $\beta$ ), 1.74 (2H, dd,  $J=13.5$ , 4 Hz, H-2 $\beta$ , 2' $\beta$ ), 1.96 (6H, s, H-19, 19'), 1.99 (6H, s, H-20, 20'), 2.09 (2H, dd,  $J=13.5$ , 8 Hz, H-2 $\alpha$ , 2' $\alpha$ ), 2.27 (4H, t, 7 Hz, CH<sub>2</sub> fatty acid), 2.99 (2H, dd,  $J=15$ , 9 Hz, H-4 $\alpha$ , 4' $\alpha$ ), 5.24 (2H, m, H-3, 3'), 6.36 (2H, m, H-14, 14'), 6.44 (2H, d,  $J=15$  Hz, H-7, 7'), 6.55 (2H, d,  $J=15$  Hz, H-12, 12'), 6.59 (2H, d,  $J=11$  Hz, H-10, 10'), 6.68 (2H, dd,  $J=15$ , 11 Hz, H-11, 11'), 6.70 (2H, m, H-15, 15'), 7.34 (2H, d,  $J=15$  Hz, H-8, 8'), <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 12.80 (C-20, 20'), 12.87 (C-19, 19'), 14.13 (CH<sub>3</sub> fatty acid), 20.78 (C-18, 18'), 22.69 (CH<sub>2</sub> fatty acid), 24.77 (CH<sub>2</sub> fatty acid), 25.05 (C-17, 17'), 25.61 (C-16, 16'), 29.14, 29.27, 29.35, 29.47, 29.60, 29.64, 31.91, 34.65 (CH<sub>2</sub> fatty acid), 42.20 (C-4, 4'), 43.73 (C-1, 1'), 47.66 (C-2, 2'), 58.51 (C-5, 5'), 73.24 (C-3, 3'), 120.80 (C-7, 7'), 124.60 (C

-11, 11'), 131.21 (C-15, 15'), 133.9  
 5 (C-9, 9'), 134.99 (C-14, 14'), 136.  
 94 (C-13, 13'), 140.70 (C-10, 10'), 1  
 41.82 (C-12, 12'), 147.02 (C-8, 8'),  
 5 173.63 (C=O fatty acid), 202.51 (C  
 -6, 6'), FAB-MS m/z: 1076 (M<sup>+</sup>) for C  
 72H116O6 (カブソルビン-ジバルミテート), 1048 (M<sup>+</sup>) f  
 or C70H112O6 (カブソルビン-バルミテート、ミリステート)  
 , 1020 (M<sup>+</sup>) for C68H108O6 (カブソルビン-ジミリス  
 10 テート), 992 (M<sup>+</sup>) for C66H104O6 (カブソルビン-ミ  
 リステート、ラウレート), 964 (M<sup>+</sup>) for C64H100O6 (カ  
 ブソルビン-ジラウレート), カブソルビンジエステルの脂肪酸エ  
 ステル構成比 ジバルミテート体:バルミテート、ミリステート体:  
 ジミリステート体:ミリステート、ラウレート体:ジラウレート体 (

15 6:18:41:24:11)

第3図にカブソルビンジエステルの<sup>1</sup>H-NMRのチャート、第4  
 図に<sup>13</sup>C-NMRのチャートを示す。さらに、UV-VISによるチ  
 ャートを第5図に示す。第6図にカブソルビンジエステルのFAB-  
 MSチャートを示す。



表 2

構成脂肪酸	分子量	組成比
パルミチル、パルミチル	1 0 7 6	6 %
ミリスチル、パルミチル	1 0 4 8	1 8 %
ミリスチル、ミリスチル	1 0 2 0	4 1 %
ラウリル、ミリスチル	9 9 2	2 4 %
ラウリル、ラウリル	9 6 4	1 1 %

## 10 (B成分の解析)

上記分析の結果、B成分はカブサンチンジエステルであることが判明した。なお、本実施形態においてのその脂肪酸の種類と組成比は表3の通りであることが判明した。そのスペクトルデータは次の通りである。

15 UV-VIS (ether)  $\lambda$ : 468, 496 nm,  $^1\text{H-NMR}$   
 ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.86 (3H, s, H-16'), 0.88 (6H, t,  $J=7\text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_3$  fatty acid), 1.08 (3H, s, H-16), 1.11 (3H, s, H-17), 1.18 (3H, s, H-17'), 1.25 (s,  $\text{CH}_2$  fatty acid), 1.32 (6H, s, H-18'), 1.58 (1H, dd,  $J=12, 12\text{ Hz}$ ,  $2\beta$ ), 1.57 (1H, dd,  $J=15, 3.5\text{ Hz}$ , H-4'  $\beta$ ), 1.78 (1H, dd,  $J=13.5, 4\text{ Hz}$ , H-2'  $\beta$ ), 1.72 (3H, s, H-18), 1.77 (1H, ddd,  $J=12, 4, 1.5\text{ Hz}$ , H-2  $\alpha$ ), 1.96 (3H, s, H-19'), 1.97 (6H, s, H-19, 20), 1.99 (3H, s, H-20'), 2.09 (1H, dd,

$J = 13.5, 8 \text{ Hz}$ ,  $H-2' \alpha$ ),  $2.11$  ( $1 \text{ H}$ ,  $dd$ ,  $J = 15.5, 11 \text{ Hz}$ ,  $H-4 \beta$ ),  $2.45$  ( $1 \text{ H}$ ,  $ddd$ ,  $J = 15.5, 5.5, 1, 5 \text{ Hz}$ ,  $H-4 \alpha$ ),  $2.27$  ( $4 \text{ H}$ ,  $t$ ,  $7 \text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_2$  fatty acid),  $2.99$  ( $1 \text{ H}$ ,  $dd$ ,  $J = 15, 9 \text{ Hz}$ ,  $H-4' \alpha$ ),  $5.06$  ( $1 \text{ H}$ ,  $m$ ,  $H-3$ ),  $5.24$  ( $1 \text{ H}$ ,  $m$ ,  $H-3, 3'$ ),  $6.13$  ( $2 \text{ H}$ ,  $d$ ,  $AB$ -type,  $H-7, 8$ ),  $6.16$  ( $1 \text{ H}$ ,  $d$ ,  $J = 11 \text{ Hz}$ ,  $H-10$ ),  $6.23$  ( $1 \text{ H}$ ,  $d$ ,  $J = 10.5$ ,  $H-14$ ),  $6.36$  ( $1 \text{ H}$ ,  $d$ ,  $J = 15 \text{ Hz}$ ,  $H-14'$ ),  $6.36$  ( $1 \text{ H}$ ,  $d$ ,  $J = 11 \text{ Hz}$ ,  $H-14'$ ),  $6.44$  ( $1 \text{ H}$ ,  $d$ ,  $J = 15 \text{ Hz}$ ,  $H-7'$ ),  $6.55$  ( $1 \text{ H}$ ,  $d$ ,  $J = 15 \text{ Hz}$ ,  $H-12'$ ),  $6.59$  ( $1 \text{ H}$ ,  $d$ ,  $J = 11 \text{ Hz}$ ,  $H-10'$ ),  $6.64$  ( $1 \text{ H}$ ,  $dd$ ,  $J = 15, 11 \text{ Hz}$ ,  $H-11$ ),  $6.68$  ( $1 \text{ H}$ ,  $dd$ ,  $J = 15, 11 \text{ Hz}$ ,  $H-11'$ ),  $6.70$  ( $2 \text{ H}$ ,  $m$ ,  $H-15, 15'$ ),  $7.34$  ( $1 \text{ H}$ ,  $d$ ,  $J = 15 \text{ Hz}$ ,  $H-8'$ ),  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :  $12.74$  ( $\text{C}-19, 20$ ),  $12.80$  ( $\text{C}-20'$ ),  $12.87$  ( $\text{C}-19'$ ),  $14.13$  ( $\text{CH}_3$  fatty acid),  $20.78$  ( $\text{C}-18'$ ),  $21.53$  ( $\text{C}-18$ ),  $22.69$  ( $\text{CH}_2$  fatty acid),  $24.77$  ( $\text{CH}_2$  fatty acid),  $25.05$  ( $\text{C}-17'$ ),  $25.51$  ( $\text{C}-16'$ ),  $28.62$  ( $\text{C}-16$ ),  $29.14$ ,  $29.27$ ,  $29.35$ ,  $29.47$ ,  $29.60$ ,  $29.64$  ( $\text{CH}_2$  fatty acid),  $30.16$  ( $\text{C}-17$ ),  $31.91$ ,  $34.65$  ( $\text{CH}_2$  fatty acid),  $36.82$  ( $\text{C}-1$ ),  $38.60$  ( $\text{C}-4$ ),  $42.20$  ( $\text{C}-4'$ ),  $43.73$  ( $\text{C}-1'$ ),  $44.11$  ( $\text{C}-2$ ),  $47.66$  ( $\text{C}-2'$ ),  $5$

8. 51 (C-5'), 68. 50 (C-3), 73. 24 (C-3'), 120. 80 (C-7'), 124. 05 (C-11), 125. 51 (C-7), 127. 84 (C-5), 124. 60 (C-11'), 131. 20 (C-10), 131. 21 (C-15'),  
 5 , 132. 35 (C-13), 133. 95 (C-9'), 134. 99 (C-14'), 135. 87 (C-9), 136. 11 (C-14), 136. 94 (C-13'), 137. 60 (C-12), 137. 71 (C-6), 138. 41 (C-8), 140. 70 (C-10'), 141. 82 (C-12'), 147. 02 (C-8'),  
 10 , 173. 63 (C=O fatty acid), 202. 51 (C-6'), FAB-MS m/z: 1060 (M<sup>+</sup>) for C<sub>72</sub>H<sub>116</sub>O<sub>5</sub> (カブサンチン-ジバルミテート), 1032 (M<sup>+</sup>) for C<sub>70</sub>H<sub>112</sub>O<sub>5</sub> (カブサンチン-バルミテート、ミリステート), 1004 (M<sup>+</sup>) for C<sub>68</sub>H<sub>108</sub>O<sub>5</sub> (カブサンチン-ジミリステート),  
 15 , 976 (M<sup>+</sup>) for C<sub>66</sub>H<sub>104</sub>O<sub>5</sub> (カブサンチン-ミリステート, ラウレート), 948 (M<sup>+</sup>) for C<sub>64</sub>H<sub>100</sub>O<sub>5</sub> (カブサンチン-ジラウレート), 920 (M<sup>+</sup>) for C<sub>62</sub>H<sub>96</sub>O<sub>5</sub> (カブサンチン-ラウレート、カプレート), カブサンチンジエステルの脂肪酸エステル構成比 ジバルミテート体: バルミテート、ミリステート体:  
 20 : ジミリステート体: ミリステート、ラウレート体: ジラウレート体: ラウレート、カプレート体 (4: 14: 35: 36: 10: 1)

第7図にカブサンチンジエステルの<sup>1</sup>H-NMRのチャート、第8図に<sup>13</sup>C-NMRのチャートを示す。さらに、UV-VISによるチャートを第9図に示す。第10図にカブサンチンジエステルのFAB-MSチャートを示す。

表 3

構成脂肪酸	分子量	組成比
パルミチル、パルミチル	1 0 6 0	4 %
ミリスチル、パルミチル	1 0 3 2	1 4 %
ミリスチル、ミリスチル	1 0 0 4	} 3 5 %
パルミチル、ラウリル	1 0 0 4	
ラウリル、ミリスチル	9 7 6	3 6 %
ラウリル、ラウリル	9 4 8	1 0 %
ラウリル、カプリル	9 2 0	1 %

## (C成分の解析)

上記分析の結果、C成分はククルピタキサンチンA-3' エステルであることが判明した。なお、本実施形態においてのその脂肪酸の種類と組成比は表4の通りであることが判明した。そのスペクトルデータは次の通りである。

UV-VIS (ether)  $\lambda$ : 425, 444, 472 nm,  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.88 (3H, s, H-17), 0.88 (3H, t,  $J=7\text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_3$  fatty acid), 1.08 (3H, s, H-16'), 1.11 (3H, s, H-17'), 1.21 (3H, H-18), 1.25 (s,  $\text{CH}_2$  fatty acid), 1.44 (3H, s, H-16), 1.61 (1H, d,  $J=11.5\text{ Hz}$ , H-2 $\beta$ ), 1.72 (3H, s, H-18'), ~1.84 (2H, m, H-2 $\alpha$ , 2'ax), 1.95 (3H, s, H-19), 1.97 (9H, s, H-20, 19', 20'), 2.29 (2H, t,  $J=7$ ,  $\text{CH}_2$  fatty aci

d), 2.44 (1H, dd,  $J=16$ , 6 Hz, H-4'eq), 4.40 (1H, t-like,  $J=7$  Hz, H-3), 5.07 (1H, m, H-3'), 5.74 (1H, d,  $J=16$  Hz, H-7), 6.10 (2H, m, H-7', 8'), 6.16 (1H, d,  $J=11$  Hz, H-10'), 6.20 (1H, d,  $J=11$  Hz, H-10), 6.25 (2H, m, H-14, 14'), 6.36 (2H, d,  $J=15$ , H-12, 12'), 6.37 (1H, d,  $J=16$  Hz, H-8), ~6.62 (4H, m, H-11, 11', 15, 15'), FAB-MS  $m/z$ : 822 ( $M^+$ ) for  $C_{56}H_{86}O_4$  (ククルピタキサンチン-A-3'-パルミテート), 794 ( $M^+$ ) for  $C_{54}H_{82}O_4$  (ククルピタキサンチン-A-3'-ミリステート), 766 ( $M^+$ ) for  $C_{52}H_{78}O_4$  (ククルピタキサンチン-A-3'-ラウレート), ククルピタキサンチン-A-エステルの脂肪酸エステルの構成比 パルミテート:ミリステート:ラウレート (20:57:23)

第11図にククルピタキサンチンA-3'エステルの $^1H$ -NMRのチャートを示す第12図にUV-VISのチャートを示す。また、第13図にFAB-MSのチャートを示す。

20 表 4

構成脂肪酸	分子量	組成比
パルミチル	822	20%
ミリスチル	794	57%
ラウリル	766	23%

25

## (D成分の解析)

上記分析の結果、D成分は、カプサンチン3, 6-エポキシドであることが判明した。そのスペクトルデータは次の通りである。

UV-VIS (ether)  $\lambda$ : 468 nm,  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.84 (3H, s, H-16'), 0.88 (3H, s, H-17), 1.20 (3H, s, H-17'), 1.21 (3H, H-18), 1.37 (3H, s, H-18'), 1.44 (3H, s, H-16), 1.49 (1H, dd,  $J=15, 3.5\text{ Hz}$ , H-4'  $\beta$ ), 1.61 (1H, d,  $J=11.5\text{ Hz}$ , H-2  $\beta$ )  
10, 1.97 (d,  $J=11.5\text{ Hz}$ , 4  $\beta$ ), 1.71 (1H, dd,  $J=13.5, 4\text{ Hz}$ , H-2'  $\beta$ ), 1.84 (ddd,  $J=11.5, 7, 2\text{ Hz}$ , H-2  $\alpha$ ), 1.96 (6H, s, H-19, 19'), 1.98 (6H, s, H-20, 20'), 2.00 (1H, dd,  $J=13.5, 8\text{ Hz}$ , H-2'  $\alpha$ ), 2.04 (1H, ddd,  $J=12, 7, 2$ , H-4  $\alpha$ ), 2.96 (1H, dd,  $J=15, 9\text{ Hz}$ , H-4'  $\alpha$ ), 4.40 (1H, t-like,  $J=7\text{ Hz}$ , H-3), 4.51 (1H, m, H-3'), 5.76 (1H, d,  $J=16\text{ Hz}$ , H-7), 6.20 (1H, d,  $J=11\text{ Hz}$ , H-10), 6.70 (1H, d,  $J=11\text{ Hz}$ , H-14)  
20, 6.35 (1H, d,  $J=11\text{ Hz}$ , H-14'), 6.36 (1H, d,  $J=15\text{ Hz}$ , H-12), 6.38 (1H, d,  $J=16\text{ Hz}$ , H-8), 6.44 (1H, d,  $J=15\text{ Hz}$ , H-7'), 6.51 (1H, d,  $J=15\text{ Hz}$ , H-12'), 6.59 (1H, d,  $J=11\text{ Hz}$ , H-10'), ~6.66 (4H, m, H-1, 11', 15, 15'), 7.34 (1H, d,  $J=15\text{ Hz}$ , H-8'),  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 12.75 (C-20

' ), 12.88 (C-19, 20, 19'), 21.29 (C-18'), 25.09 (C-17'), 25.73 (C-16), 25.86 (C-16'), 31.58 (C-18), 32.16 (C-17), 43.97 (C-1, 1'), 45.29 (C-4'), 47.71 (C-4), 48.49 (C-2), 50.83 (C-2'), 58.93 (C-5'), 70.34 (C-3'), 75.38 (C-3), 82.45 (C-5), 91.65 (C-6), 120.86 (C-7'), 123.11 (C-7), 124.08 (C-11'), 125.40 (C-11'), 129.72 (C-15'), 131.60 (C-10), 132.44 (C-14), 133.62 (C-9'), 134.81 (C-8), 135.19 (C-9), 135.24 (C-14'), 135.92 (C-13), 137.51 (C-13'), 135.92 (C-12), 140.71 (C-10'), 141.97 (C-12'), 146.87 (C-8'), 202.93 (C-6'), FAB-MS  $m/z$ : 600 ( $M^+$ ) for  $C_{40}H_{56}O_4$

第14図にカブサンチン3, 6-エポキシドの $^1H$ -NMRチャートを示す。第15図に $^{13}C$ -NMRのチャートを示す。第16図にUV-VISのチャートを示す。第17図にFAB-MSのチャートを示す。

#### (E成分の解析)

上記分析の結果、E成分は、カブソルピンであることが判明した。そのスペクトルデータは次の通りである。

UV-VIS (ether)  $\lambda$ : 445, 479, 510 nm,  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$ : 0.84 (6H, s, H-16, 16')

), 1.21 (6H, s, H-17, 17'), 1.37 (6H, s,  
 H-18, 18'), 1.49 (2H, dd, J=15, 3.5 Hz,  
 H-4 $\beta$ , 4' $\beta$ ), 1.71 (2H, dd, J=13.5, 4  
 Hz, H-2 $\beta$ , 2' $\beta$ ), 1.96 (6H, s, H-19, 19')  
 5 ), 1.99 (6H, s, H-20, 20'), 2.00 (2H, d  
 d, J=13.5, 8 Hz, H-2 $\alpha$ , 2' $\alpha$ ), 2.96 (2H,  
 dd, J=15, 9 Hz, H-4 $\alpha$ , 4' $\alpha$ ), 4.51 (2H, m,  
 H-3, 3'), 6.36 (2H, m, H-14, 14'), 6.  
 44 (2H, d, J=15 Hz, H-7, 7'), 6.55 (2H,  
 10 d, J=15 Hz, H-12, 12'), 6.59 (2H, d, J=  
 11 Hz, H-10, 10'), 6.68 (2H, dd, J=15,  
 11 Hz, H-11, 11'), 6.70 (2H, m, H-15, 1  
 5'), 7.34 (2H, d, J=15 Hz, H-8, 8'), F A  
 B-M S m/z : 600 (M<sup>+</sup>) for C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>O<sub>4</sub>

15 第18図にカブソルピンの<sup>1</sup>H-NMRチャートを示す。第19図  
 にUV-VISのチャートを示す。第20図にFAB-MSのチャ  
 ートを示す。

#### (F成分の解析)

20 上記分析の結果、F成分はカブサンチンモノエステルであることが  
 判明した。なお、本実施形態においてのその脂肪酸の種類と構成比は  
 表5の通りであることが判明した。そのスペクトルデータは次の通り  
 である。

UV-VIS (ether)  $\lambda$  : 468, 496 nm, <sup>1</sup>H-NMR  
 25 (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 0.86 (3H, s, H-16'), 0.88 (  
 3H, t, J=7 Hz, CH<sub>3</sub> fatty acid), 1.07



(6 H, s, H-16, 17), 1.18 (3 H, s, H-17'),  
 , 1.25 (s, CH<sub>2</sub> fatty acid), 1.32 (6 H  
 , s, H-18'), 1.48 (1 H, dd, J=12, 12 Hz,  
 2β), 1.57 (1 H, dd, J=15, 3.5 Hz, H-4'β)  
 5 ) , 1.74 (1 H, dd, J=13.5, 4 Hz, H-2'β),  
 1.74 (3 H, s, H-18), 1.77 (1 H, ddd, J=1  
 2, 4, 1.5 Hz, H-2α), 1.96 (3 H, s, H-19'  
 ), 1.97 (6 H, s, H-19, 20), 1.99 (3 H, s,  
 H-20'), 2.09 (1 H, dd, J=13.5, 8 Hz, H-  
 10 2'α), 2.04 (1 H, dd, J=15.5, 11 Hz, H-4  
 β), 2.39 (1 H, ddd, J=15.5, 5.5, 1.5 Hz  
 , H-4α), 2.27 (2 H, t, 7 Hz, CH<sub>2</sub> fatty  
 acid), 2.99 (1 H, dd, J=15, 9 Hz, H-4'α  
 ), 4.00 (1 H, m, H-3), 5.24 (1 H, m, H-3,  
 15 3'), 6.13 (2 H, d, AB-type, H-7, 8), 6.  
 16 (1 H, d, J=11 Hz, H-10), 6.23 (1 H, d,  
 J=10.5, H-14), 6.36 (1 H, d, J=15 Hz, H  
 -12), 6.36 (1 H, d, J=11 Hz, H-14'), 6.  
 44 (1 H, d, J=15 Hz, H-7'), 6.55 (1 H, d,  
 20 J=15 Hz, H-12'), 6.59 (1 H, d, J=11 Hz,  
 H-10'), 6.64 (1 H, dd, J=15, 11 Hz, H-1  
 1), 6.68 (1 H, dd, J=15, 11 Hz, H-11'),  
 6.70 (2 H, m, H-15, 15'), 7.34 (1 H, d, J  
 =15 Hz, H-8'), <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 12.7  
 25 4 (C-19, 20), 12.80 (C-20'), 12.87 (C  
 -19'), 14.13 (CH<sub>3</sub> fatty acid), 20.

78 (C-18'), 21.63 (C-18), 22.69 (CH<sub>2</sub>  
 fatty acid), 24.77 (CH<sub>2</sub> fatty ac  
 id), 25.05 (C-17'), 25.61 (C-16'), 2  
 8.72 (C-16), 29.14, 29.27, 29.35, 29  
 5 .47, 29.60, 29.64 (CH<sub>2</sub> fatty acid)  
 , 30.26 (C-17), 31.91, 34.65 (CH<sub>2</sub> fa  
 tty acid), 37.12 (C-1), 42.20 (C-4'  
 ), 42.54 (C-4), 43.73 (C-1'), 47.66 (C-2'  
 ), 48.40 (C-2), 58.51 (C-5'), 65  
 10 .08 (C-3), 73.24 (C-3'), 120.80 (C-7'  
 ), 124.05 (C-11), 125.51 (C-7), 125  
 .84 (C-5), 124.60 (C-11'), 131.20 (C-  
 -10), 131.21 (C-15'), 132.35 (C-13)  
 , 133.95 (C-9'), 134.99 (C-14'), 135  
 15 .87 (C-9), 136.11 (C-14), 136.94 (C-  
 13'), 137.60 (C-12), 137.71 (C-6), 1  
 38.41 (C-8), 140.70 (C-10'), 141.82  
 (C-12'), 147.02 (C-8'), 173.63 (C=O  
 fatty acid), 202.51 (C-6'), FAB-M  
 20 S m/z: 822 (M<sup>+</sup>) for C<sub>56</sub>H<sub>82</sub>O<sub>4</sub> (カブサンチン-3'  
 -パルミテート), 794 (M<sup>+</sup>) for C<sub>54</sub>H<sub>82</sub>O<sub>4</sub> (カブサンチン  
 -3'-ミリステート), 766 (M<sup>+</sup>) for C<sub>52</sub>H<sub>78</sub>O<sub>4</sub> (カブサ  
 ンチン-3'-ラウレート), カブサンチン-3'-エステルの脂肪  
 酸エステル構成比 パルミテート体:ミリステート体:ラウレート体  
 25 : (12:70:18)

第21図にカブサンチンモノエステルの<sup>1</sup>H-NMRチャートを示

す。第 2 2 図に  $^{13}\text{C}$ -NMR のチャートを示す。第 2 3 図に UV-VIS のチャートを示す。第 2 4 図に FAB-MS のチャートを示す。

表 5

構成脂肪酸	分子量	組成比
パルミチル	822	12%
ミリスチル	794	70%
ラウリル	766	18%

## (G 成分の解析)

上記分析の結果、G 成分はカブサンチンであることが判明した。そのスペクトルデータは次の通りである。

UV-VIS (ether)  $\lambda$ : 468, 496 nm,  $^1\text{H}$ -NMR  
 (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.84 (3H, s, H-16'), 1.07 (6H, s, H-16, 17), 1.21 (3H, s, H-17'),  
 1.37 (6H, s, H-18'), 1.48 (1H, dd,  $J=12$ , 12 Hz, 2 $\beta$ ), 1.49 (1H, dd,  $J=15$ , 3.5 Hz, H-4'  $\beta$ ), 1.71 (1H, dd,  $J=13.5$ , 4 Hz, H-2'  $\beta$ ), 1.74 (3H, s, H-18), 1.77 (1H, ddd,  $J=12$ , 4, 1.5 Hz, H-2 $\alpha$ ), 1.96 (3H, s, H-19'), 1.97 (6H, s, H-19, 20), 1.99 (3H, s, H-20'), 2.00 (1H, dd,  $J=13.5$ , 8 Hz, H-2'  $\alpha$ ), 2.04 (1H, dd,  $J=15.5$ , 1 Hz, H-4 $\beta$ ), 2.39 (1H, ddd,  $J=15.5$ , 5.5, 1.5 Hz, H-4 $\alpha$ ), 2.96 (1H, dd,  $J=15$ , 9

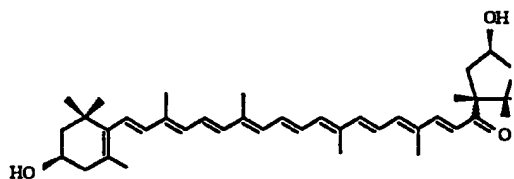
H z, H-4'  $\alpha$ ), 4.00 (1H, m, H-3), 4.51 (1  
 H, m, H-3, 3'), 6.13 (2H, d, AB-type, H  
 -7, 8), 6.16 (1H, d, J=11 Hz, H-10), 6.  
 23 (1H, d, J=10.5, H-14), 6.36 (1H, d,  
 5 J=15 Hz, H-12), 6.36 (1H, d, J=11 Hz, H  
 -14'), 6.44 (1H, d, J=15 Hz, H-7'), 6.  
 55 (1H, d, J=15 Hz, H-12'), 6.59 (1H, d  
 , J=11 Hz, H-10'), 6.64 (1H, dd, J=15,  
 11 Hz, H-11), 6.68 (1H, dd, J=15, 11 Hz  
 10 , H-11'), 6.70 (2H, m, H-15, 15'), 7.3  
 4 (1H, d, J=15 Hz, H-8'), <sup>13</sup>C-NMR (CDCl  
 3)  $\delta$ : 12.78 (C-19, 20), 12.75 (C-20')  
 , 12.88 (C-19'), 21.39 (C-18'), 21.6  
 3 (C-18), 25.20 (C-17'), 25.90 (C-16  
 15 '), 28.72 (C-16), 30.26 (C-17), 37.1  
 2 (C-1), 42.50 (C-4), 43.97 (C-1'), 4  
 5.40 (C-4'), 48.69 (C-2), 50.93 (C-2  
 '), 58.93 (C-5'), 65.08 (C-3), 70.39  
 (C-3'), 120.80 (C-7'), 124.05 (C-11  
 20 ), 125.51 (C-7), 126.20 (C-5), 124.6  
 0 (C-11'), 131.20 (C-10), 131.21 (C-  
 15'), 132.35 (C-13), 133.95 (C-9'),  
 134.99 (C-14'), 135.87 (C-9), 136.1  
 1 (C-14), 136.94 (C-13'), 137.60 (C-  
 25 12), 137.81 (C-6), 138.41 (C-8), 140  
 .70 (C-10'), 141.82 (C-12'), 147.02

(C-8'), 202.51 (C-6'), FAB-MS  $m/z$ :  
584 ( $M^+$ ) for  $C_{40}H_{56}O_3$

第25図にカプサンチンの $^1H$ -NMRチャートを示す。第26図  
に $^{13}C$ -NMRのチャートを示す。第27図にUV-VISのチャ  
5 トを示す。第28図にFAB-MSのチャートを示す。

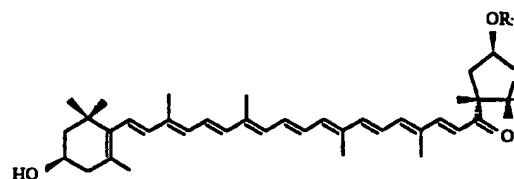
これらのカプサンチン、カプサンチンモノエステル、カプサンチン  
ジエステル、カプソルビンジエステル、カプサンチン3,6-エポキ  
シド、カプソルビン、ククルビタキサンチンA-3'エステルはカロ  
10 テノイドの一種でありそれぞれ次の構造式を有する。なお、これらの  
カロテノイドがエステルである場合においては、その脂肪酸 $R_1$ およ  
び $R_2$ は特に限定されるものではない。なお、これらのカロテノイド  
がパラディチヨムパブリカから抽出された場合においては上述のよう  
にその構成脂肪酸の種類は上記各表の通りである。

15 化学式 1  
カプサンチン



20

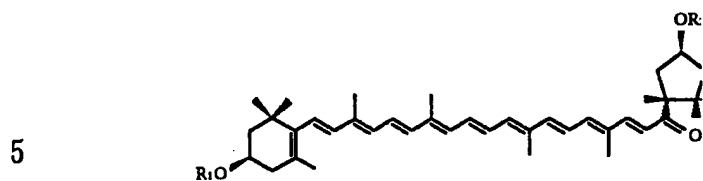
化学式 2  
カプサンチンモノエステル



25

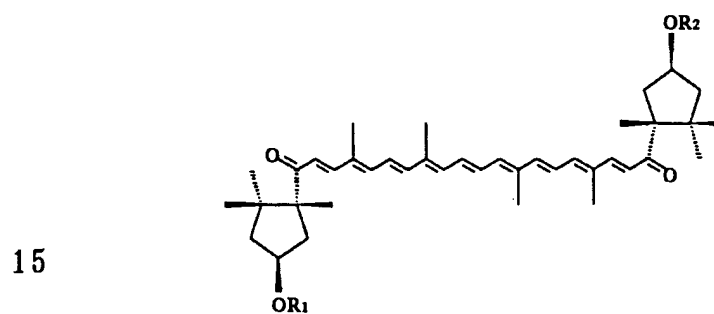
化学式 3

カブサンチンジエステル



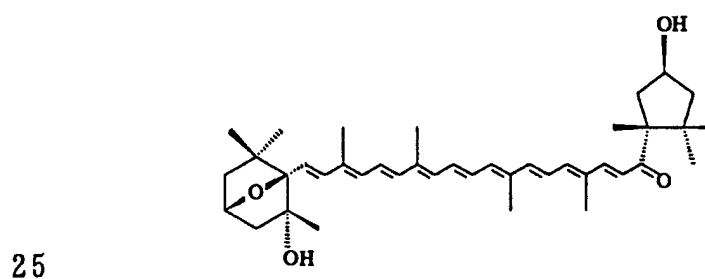
化学式 4

10           カブソルビンジエステル



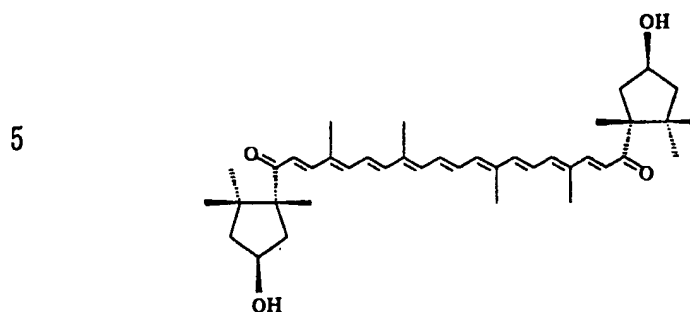
化学式 5

20 カプサンチン 3, 6-エポキシド



## 化学式 6

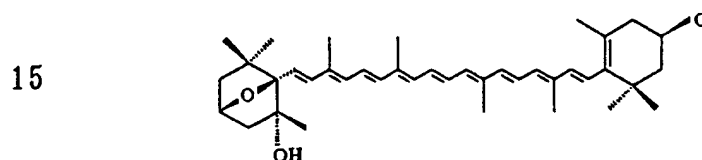
## カブソルピン



10

## 化学式 7

## ククルビタキサンチン A - 3' エステル



## 20 (エプスタイン-バー ル ウイルス・ゲノムの発現阻害活性の測定)

これらのカロテノイドを用い、エプスタイン-バー ル ウイルス・ゲノムの発現阻害活性の測定を次の条件で行った。エプスタイン-バー ル ウイルス潜在感染ヒトリンパ芽球細胞株、ラジ細胞の培養液として PRMI 1640 に胎仔血清及び抗生物質を加えたものを使用した。この培養条件下で、エプスタイン-バー ル ウイルス早期抗原の自然発生率は 0.1% 以下である。  $1 \times 10^6$  細胞 / ml の濃度に調

25

整したラジ細胞を、4 mMのn-酪酸、20 ng/mlのTPA、それに1000 Mol ratio/TPA(20ng=32pmol/ml)の被検物質を加えた上記培養液中で37℃、48時間培養した、上咽頭癌患者血清を用いた間接蛍光抗体法にてエプスタイン-バーウイルス早期抗原を発現した細胞を検出し、陽性細胞の比率を被検物質を加えなかったコントロールに対して算出し、ウイルス・ゲノムの再現阻害活性とした。さらに被検物質の濃度を500 Mol ratio/TPA(20ng=32pmol/ml)、100 Mol ratio/TPA(20ng=32pmol/ml)に変化させて同活性を測定した。この結果を表6に示す。

表 6

濃度 <sup>1)</sup>	1000	500	100	10
カフ°サンチン <sup>2)</sup>	91.4 (70)	59.7	17.6	0
カフ°サンチンモノエステル <sup>2)</sup>	96.8 (70)	68.4	26.6	4.1
カフ°サンチンジエステル <sup>2)</sup>	100 (70)	75.5	30.7	9.6
カフ°ソルビトールジエステル <sup>2)</sup>	100 (70)	73.9	28.0	7.2
クルヒ°タキサンチンA-3' エステル <sup>2)</sup>	100 (70)	61.0	13.8	0
カフ°サンチン3,6-エポキシド <sup>2)</sup>	100 (70)	67.2	20.8	5.4
カフ°ソルビトール <sup>2)</sup>	100 (70)	64.1	19.9	0
β-カロテン <sup>2)</sup>	97.5 (70)	75.0	10.6	0

単位 1) Mol ratio/TPA(20ng=32pmol/ml)

2) %抑制率 (%ラジ細胞生存率)

パラディチヨムパブリカから抽出した上記のカロテノイド成分は、



抗発癌プロモーターとして知られている $\beta$ -カロテンとほぼ同様以上の強い発癌ウイルス活性化阻害作用を示した。また、ラジ細胞生存率も70%を維持しており、細胞に対する毒性はほとんど認められないことが判明した。従って、上記カロテノイド成分は発癌抑制作用を有し、上記カロテノイドは発癌抑制剤の有効成分とすることができることが見出された。

(マウス皮膚二段階発癌抑制試験)

上記のようにこれらのカロテノイドは強い発癌ウイルス活性化阻害作用を示すことが確認することができた。そこで、カプサンチン、カプサンチンモノエステル、カプサンチンジエステルについて発癌抑制効果を明確にするため、マウスを用いる皮膚癌の抑制試験を行った。すなわち、マウス皮膚二段階発癌抑制試験を次の条件で行った。

一群15匹のICR雌性マウス(6週齢)の背部体毛を剃毛して24時間後、背部皮膚にアセトン(0.1ml)に溶解したDMBA(100 $\mu$ g、390nmol)を塗布してイニシエーションを行い、1週間後から各実験群を以下のように処理した。

第1群：アセトン(0.1ml)に溶解したTPA(1 $\mu$ g、1.7nmol)を週2回、20週間塗布し続けることによりプロモーションを行う。この際、TPA塗布1時間前にアセトン(0.1ml)を同部位に塗布する(陽性コントロール群)。

第2～第4群：第1群と同様に、週2回、20週間にわたりTPA(1 $\mu$ g、1.7nmol)塗布1時間前にアセトン(0.1ml)に溶解した被検試料(カプサンチン類)(メタノールエキスの溶媒をとばして分離したもの)85nmolを塗布する。なお、被検試料は第2群：カプサンチン、第3群：カプサンチンモノエステル、第4群：カプサン

チンジエステルとした。

5 T P A 塗布によるプロモーション開始 20 週後まで、各週ごとにマウス背部に発生するパピローマを観察し、パピローマの発生したマウスの率と 1 匹あたりに発生したパピローマの平均個数とを陽性コントロール群と比較して評価した。その結果を第 29 図及び第 30 図に示す。

10 第 29 図より試験の結果、陽性コントロール群ではプロモーション開始 7 週目に最初の腫瘍が形成され、11 週目にすべてのマウスに腫瘍が形成されたのに対し、第 2 群（カブサンチン処理群）では 7 週目に、第 3 群（カブサンチンモノエステル処理群）及び第 4 群（カブサンチンジエステル処理群）ではいずれも 9 週目にはじめて腫瘍の形成が見られ腫瘍の形成を遅延させることが明らかとなった。また、試験終了時の 20 週後においても、第 4 群では 13.3% のマウスには腫瘍形成が見られなかった。

15 第 30 図の結果より、マウス 1 匹あたりの平均腫瘍個数は 20 週後で、陽性コントロール群では 9.1 個であったのに対し、第 2 群では 7.2 個、第 3 群では 6.5 個、第 4 群では 5.0 個であり、それぞれ約 23%、31%、45% の発癌抑制効果が認められた。

20 このことから、カブサンチン、カブサンチンモノエステル、カブサンチンジエステルは、マウス皮膚二段階発癌抑制試験においても発癌抑制作用を有することが見出された。

#### 産業上の利用可能性

25 本発明によれば、エプスタイン バールウイルス活性化抑制能を有するものを含め、天然由来の優れた発癌抑制剤を提供できる。したがって、本発明の発癌抑制剤及びパラディチヨムパブリカのエキスは発

癌予防効果が期待でき、それらの作用から医薬品、化粧品、健康食品の各分野に応じ、多岐にわたる利用が可能となる。

## 請求の範囲

1. カプサンチンを有効成分とする発癌抑制剤。
2. カプサンチンの脂肪酸エステルを有効成分とする発癌抑制剤。
- 5 3. カプサンチンの脂肪酸モノエステルを有効成分とする請求の範囲第2項に記載の発癌抑制剤。
4. カプサンチンの脂肪酸ジエステルを有効成分とする請求の範囲第2項に記載の発癌抑制剤。
5. カプサンチンの脂肪酸エステルを構成する脂肪酸の少なくとも1  
10 つがパルミチン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸のいずれかである請求の範囲第2項乃至第4項のいずれかに記載の発癌抑制剤。
6. カプソルピンジエステルを有効成分とする発癌抑制剤。
7. カプソルピンの脂肪酸エステルを構成する脂肪酸の少なくとも1  
15 つがパルミチン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸のいずれかである請求の範囲第6項に記載の発癌抑制剤。
8. ククルビタキサンチンA-3' エステルを有効成分とする発癌抑制剤。
9. ククルビタキサンチンA-3' エステルがパルミチン酸エステル、ラウリン酸エステル、ミリスチン酸エステルのいずれかである請求  
20 の範囲第8項に記載の発癌抑制剤。
10. カプサンチン3, 6-エポキシドを有効成分とする発癌抑制剤。
11. カプソルピンを有効成分とする発癌抑制剤。
12. 請求の範囲第1項、第2項、第6項、第8項、第10項、第1  
25 1項に記載の有効成分を少なくとも2以上含む発癌抑制剤。
13. 請求の範囲第3項及び第4項に記載の有効成分を含む発癌抑制

剤。

14. パラディチヨムパブリカの抽出エキスをを用いる発癌抑制剤。

15. パラディチヨムパブリカから抽出されるカロテノイドを有効成分とする発癌抑制剤。

5 16. 有効成分がパラディチヨムパブリカから抽出されたものである請求の範囲第1項乃至第13項のいずれかに記載の発癌抑制剤。

17. パラディチヨムパブリカから抽出された発癌抑制作用をもつ植物抽出エキス。

10 18. 請求の範囲第1項、第2項、第6項、第8項、第10項、第11項に記載のいずれかの有効成分を少なくとも1以上含む、パラディチヨムパブリカから抽出された請求の範囲第17項に記載の植物抽出エキス。

15 19. 請求の範囲第3項及び第4項に記載の有効成分を含む、パラディチヨムパブリカから抽出された請求の範囲第17項に記載の植物抽出エキス。

## 補正書の請求の範囲

[1998年5月8日(08.05.98)国際事務局受理:出願当初の請求の範囲1は取り下げられた;新しい請求の範囲20-22が加えられた;他の請求の範囲は変更なし。(2頁)]

1. (削除)
2. カプサンチンの脂肪酸エステルを有効成分とする発癌抑制剤。
3. カプサンチンの脂肪酸モノエステルを有効成分とする請求の範囲第2項に記載の発癌抑制剤。
4. カプサンチンの脂肪酸ジエステルを有効成分とする請求の範囲第2項に記載の発癌抑制剤。
5. カプサンチンの脂肪酸エステルを構成する脂肪酸の少なくとも1つがパルミチン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸のいずれかである請求の範囲第2項乃至第4項のいずれかに記載の発癌抑制剤。
6. カプソルピンジエステルを有効成分とする発癌抑制剤。
7. カプソルピンの脂肪酸エステルを構成する脂肪酸の少なくとも1つがパルミチン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸のいずれかである請求の範囲第6項に記載の発癌抑制剤。
8. ククルビタキサンチンA-3'エステルを有効成分とする発癌抑制剤。
9. ククルビタキサンチンA-3'エステルがパルミチン酸エステル、ラウリン酸エステル、ミリスチン酸エステルのいずれかである請求の範囲第8項に記載の発癌抑制剤。
10. カプサンチン3,6-エポキシドを有効成分とする発癌抑制剤。
11. カプソルピンを有効成分とする発癌抑制剤。
12. 請求の範囲第1項、第2項、第6項、第8項、第10項、第11項に記載の有効成分を少なくとも2以上含む発癌抑制剤。
13. 請求の範囲第3項及び第4項に記載の有効成分を含む発癌抑制剤。

14. パラディチヨムパブリカの抽出エキスをを用いる発癌抑制剤。
15. パラディチヨムパブリカから抽出されるカロテノイドを有効成分とする発癌抑制剤。
16. 有効成分がパラディチヨムパブリカから抽出されたものである請求の範囲第1項乃至第13項のいずれかに記載の発癌抑制剤。
17. パラディチヨムパブリカから抽出された発癌抑制作用をもつ植物抽出エキス。
18. 請求の範囲第1項、第2項、第6項、第8項、第10項、第11項に記載のいずれかの有効成分を少なくとも1以上含む、パラディチヨムパブリカから抽出された請求の範囲第17項に記載の植物抽出エキス。
19. 請求の範囲第3項及び第4項に記載の有効成分を含む、パラディチヨムパブリカから抽出された請求の範囲第17項に記載の植物抽出エキス。
20. (追加) カプサンチンを有効成分として含むパラディチヨムパブリカから抽出された植物抽出エキス。
21. (追加) 請求の範囲第17項、第18項、第19項、第20項の植物抽出エキスをを含む化粧品。
22. (追加) 請求の範囲第17項、第18項、第19項、第20項の植物抽出エキスをを含む食品。

## 条約 19 条 (1) に基づく説明書

請求の範囲 1 は引用例にカプサンチンがエプスタインバー  
ルウイルス早期抗原発現抑制試験に対し好結果を発揮する旨  
が記載されていることから、今回の補正により削除した。

引用例 1 (TSUSHIMA Miyuki, et al.,) にはカプサンチ  
ン及びククルピタキサンチン A についての記載はあるが、そ  
のエステルについては記載がない。

引用例 2 (JOZEF Deli, et al., J. Agric. Food Chem.,  
Vol40, No.11) 及び引用例 3 (JOZEF Deli, et al., J. Agric.  
Food Chem., Vol44, No.3) は *capsicum annuum* 種に属する  
パプリカの成熟過程において、カロテノイドの種類及び量を  
調査した文献であり、これらのカロテノイドのエステルにつ  
いては一切記載されていない。

引用例 4 (KAPADIA Govind J., et al.,) にはカプサンチ  
ンについての記載はあるがそのエステルについては記載がな  
い。

引用例 5 (STAHL, Wilhelm., et al.,) にはカプソルピン  
が 1 重項酸素の消去作用があることを記載しているにすぎず、  
そのエステルについては何ら記載がない。

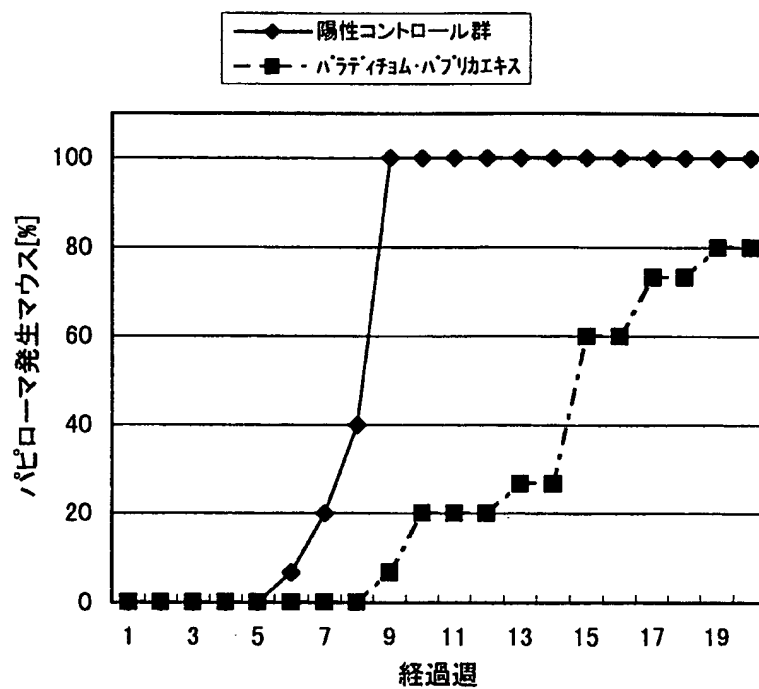
本発明は、カプサンチンの脂肪酸エステルについては *in*  
*vivo* において発癌抑制効果を有していることを明確に記載  
している。また、そのエステルの発癌抑制効果は、引用例 1  
と比較して顕著に優れている。また、ククルピタキサンチン



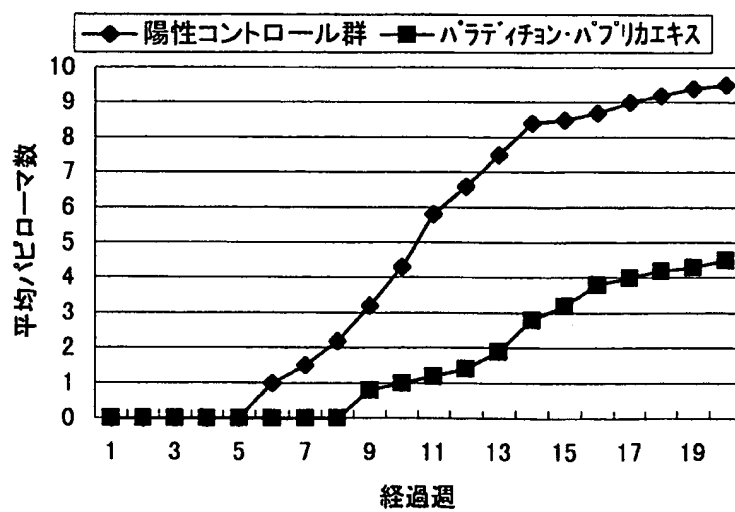
A-3' エステル、カプサンチン 3, 6-エポキシド、カプソルビン、カプソルビンジエステルについては、エプスタインバーウイルス早期抗原発現抑制試験において好結果を示しており、その抑制効果については従来のものと比較して、より顕著な効果を有している。

1 / 28

第1図

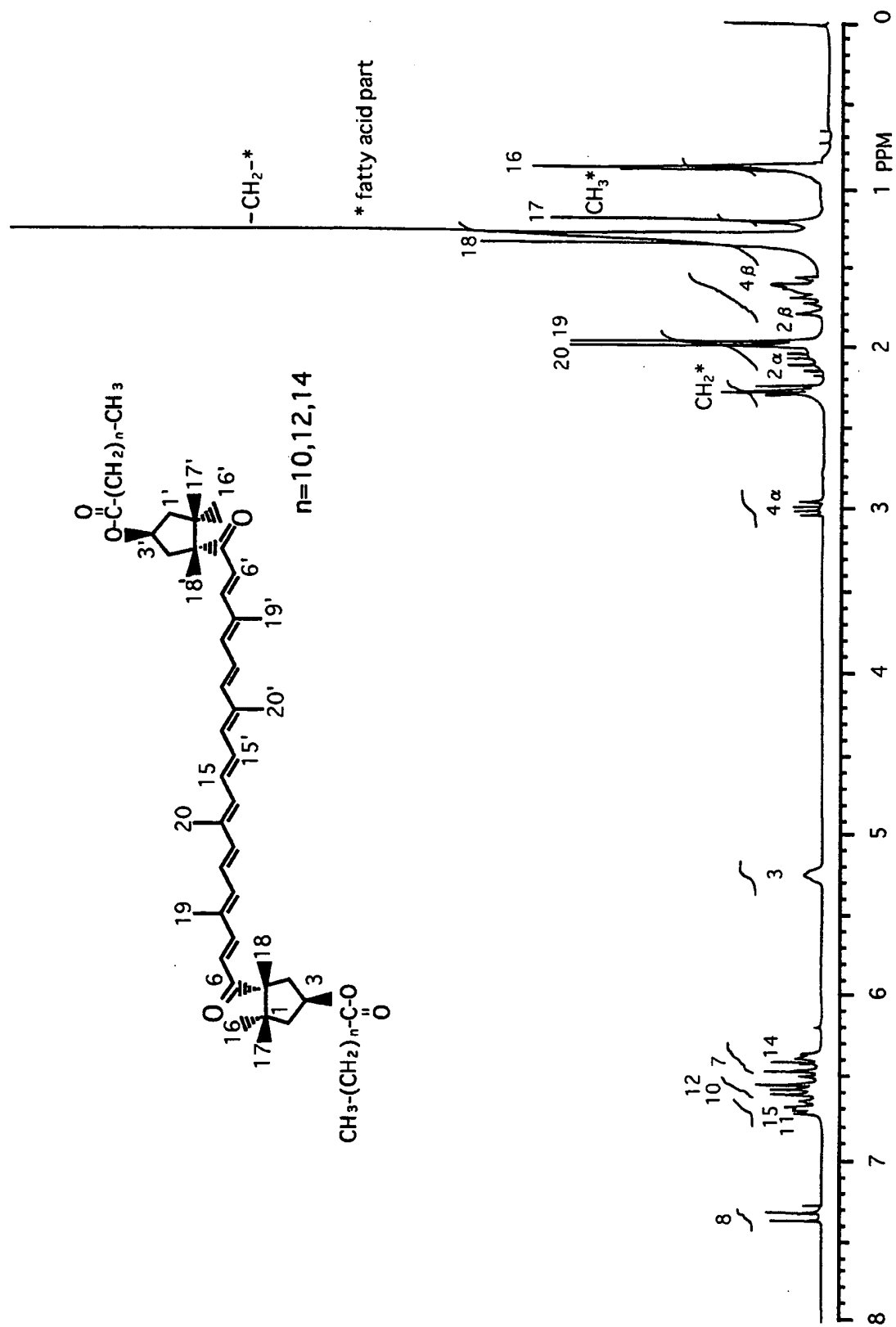


第2図



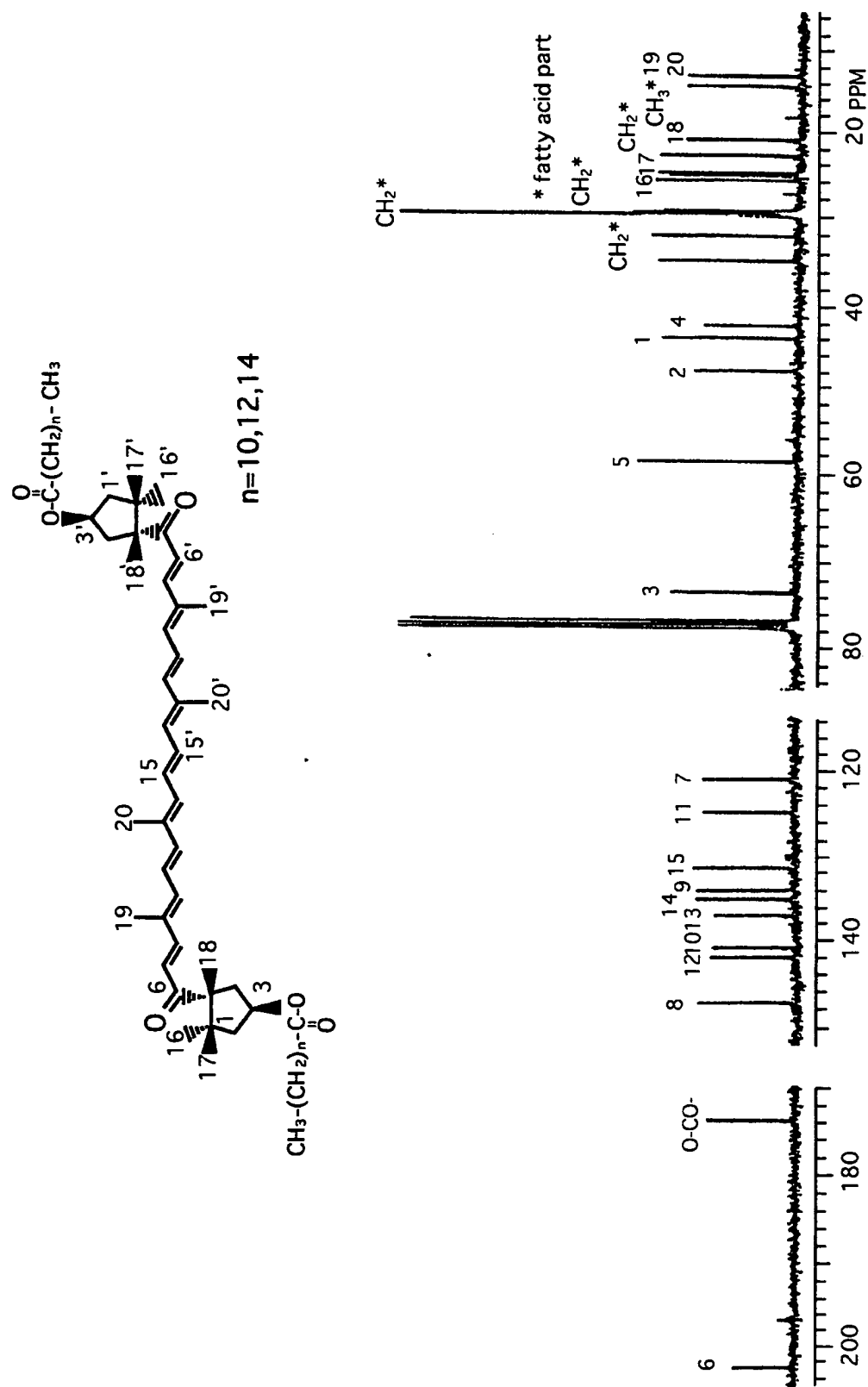
2 / 28

第3図

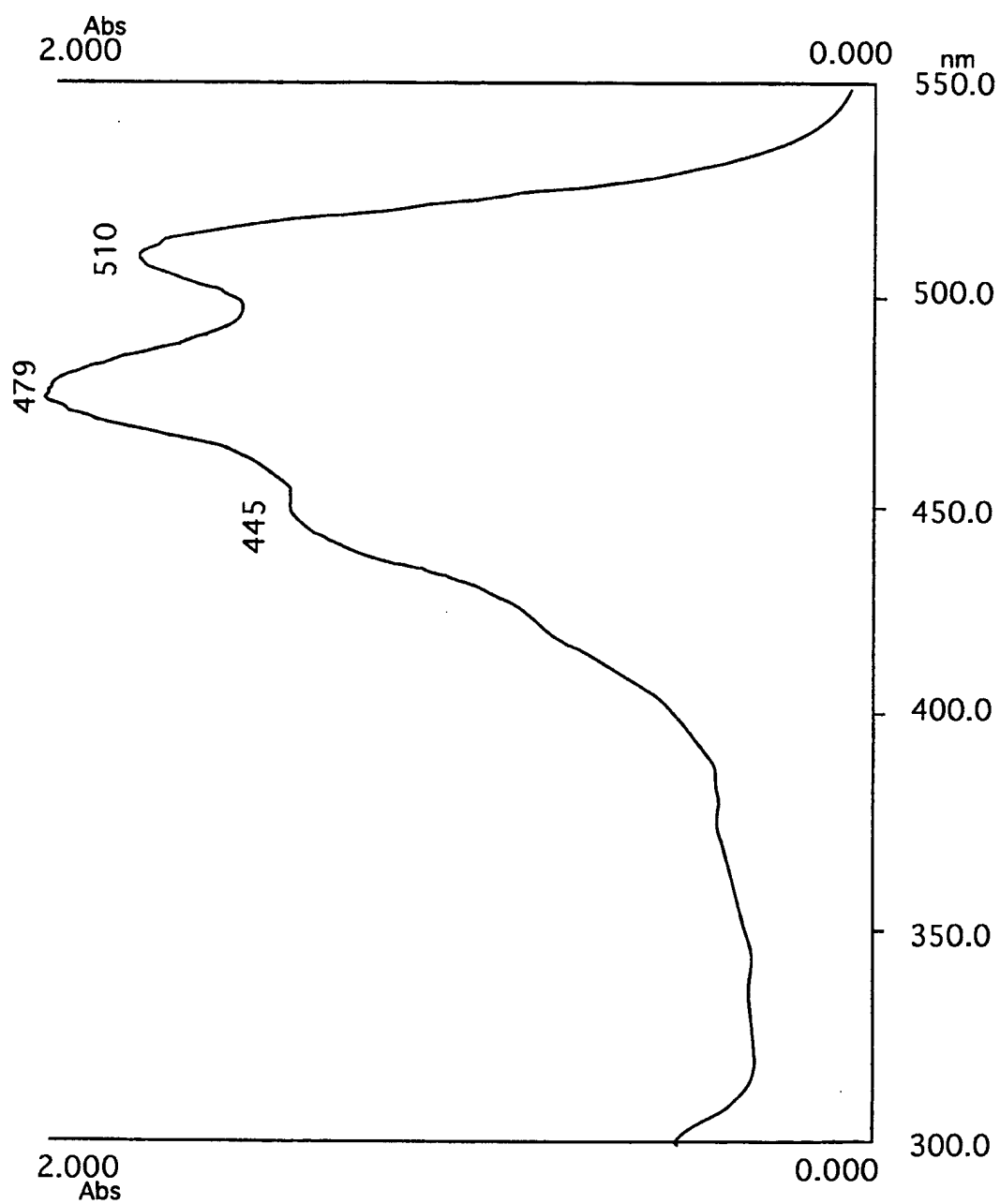


3 / 2 8

第 4 図

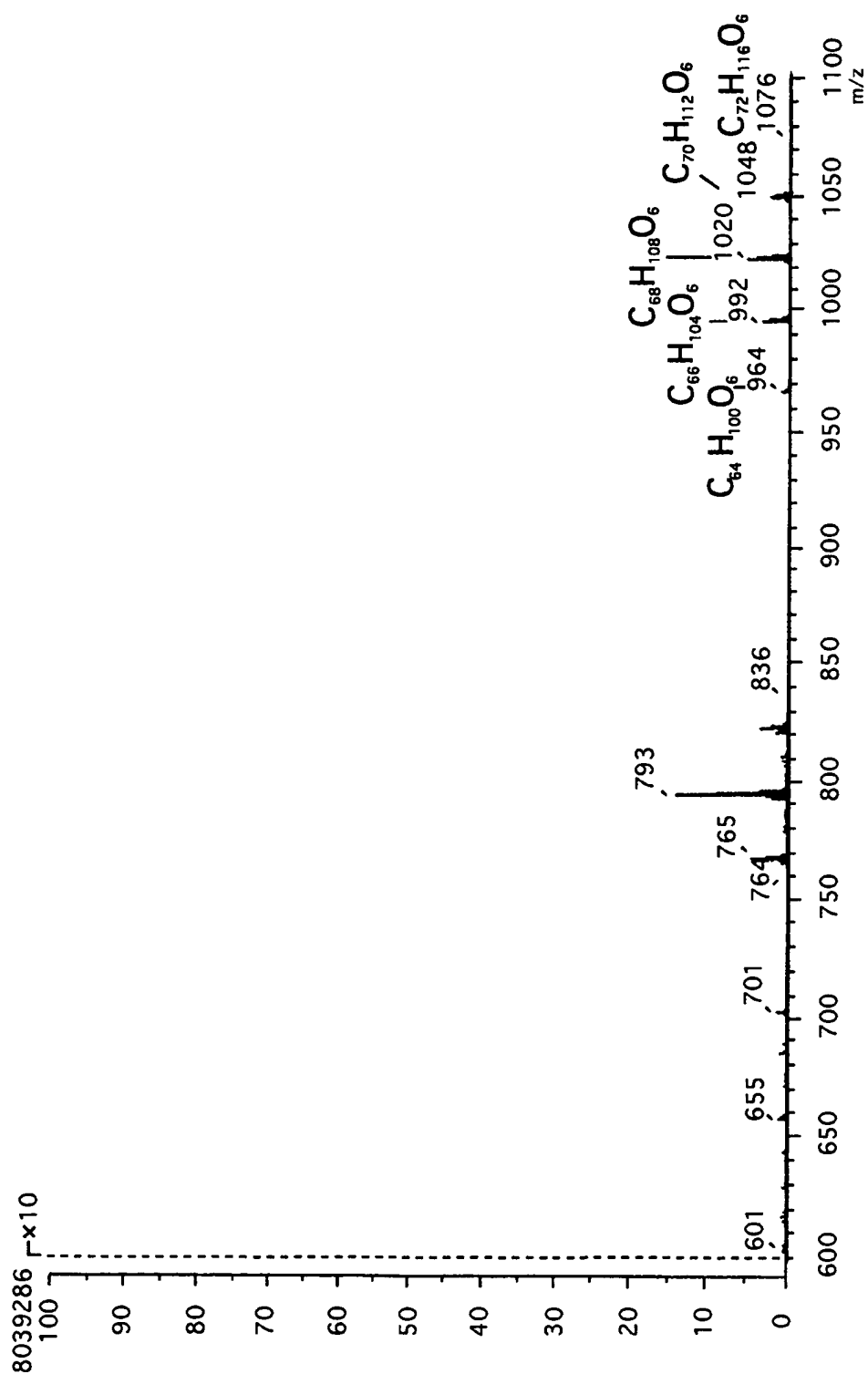


第5図



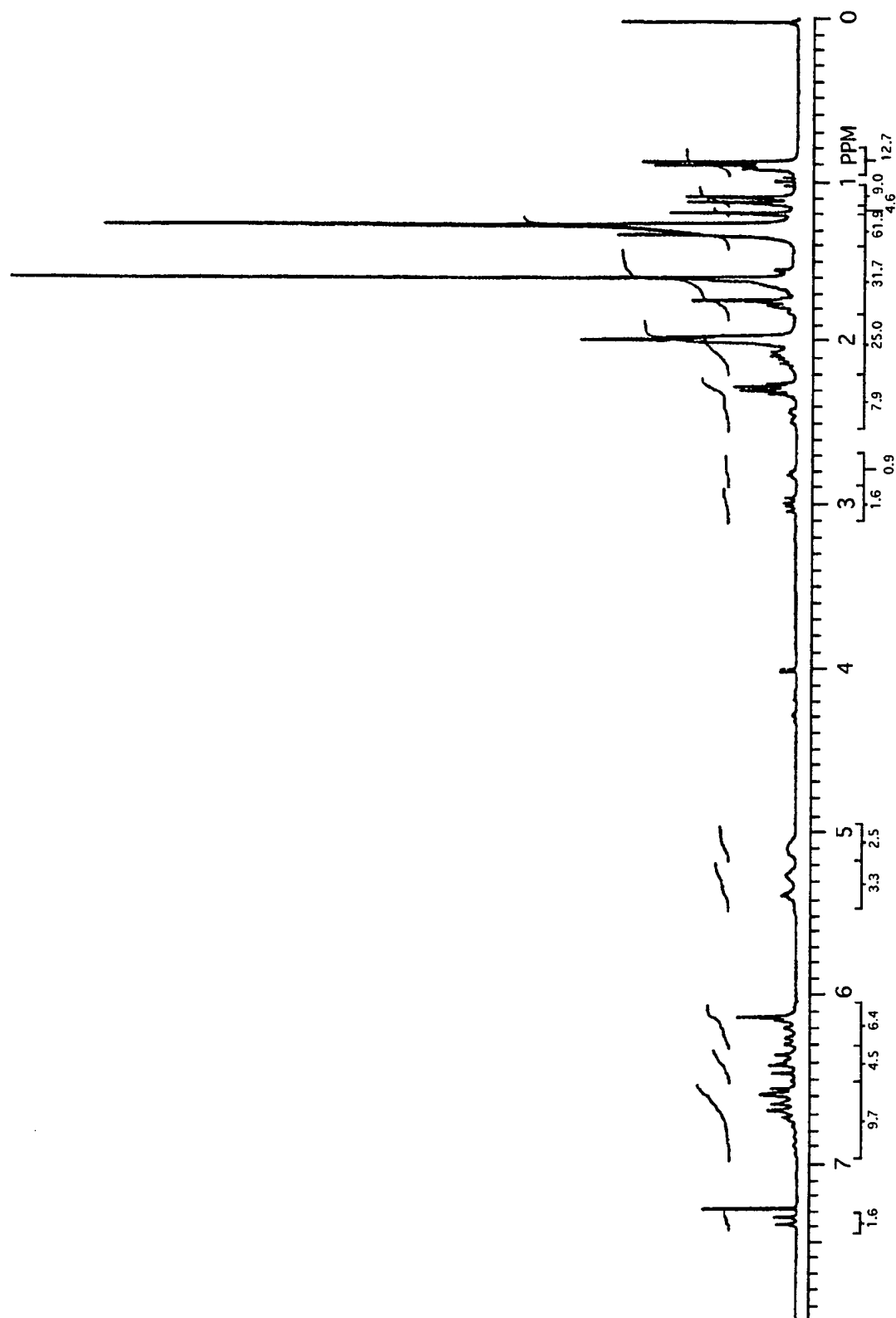
5 / 28

第6図



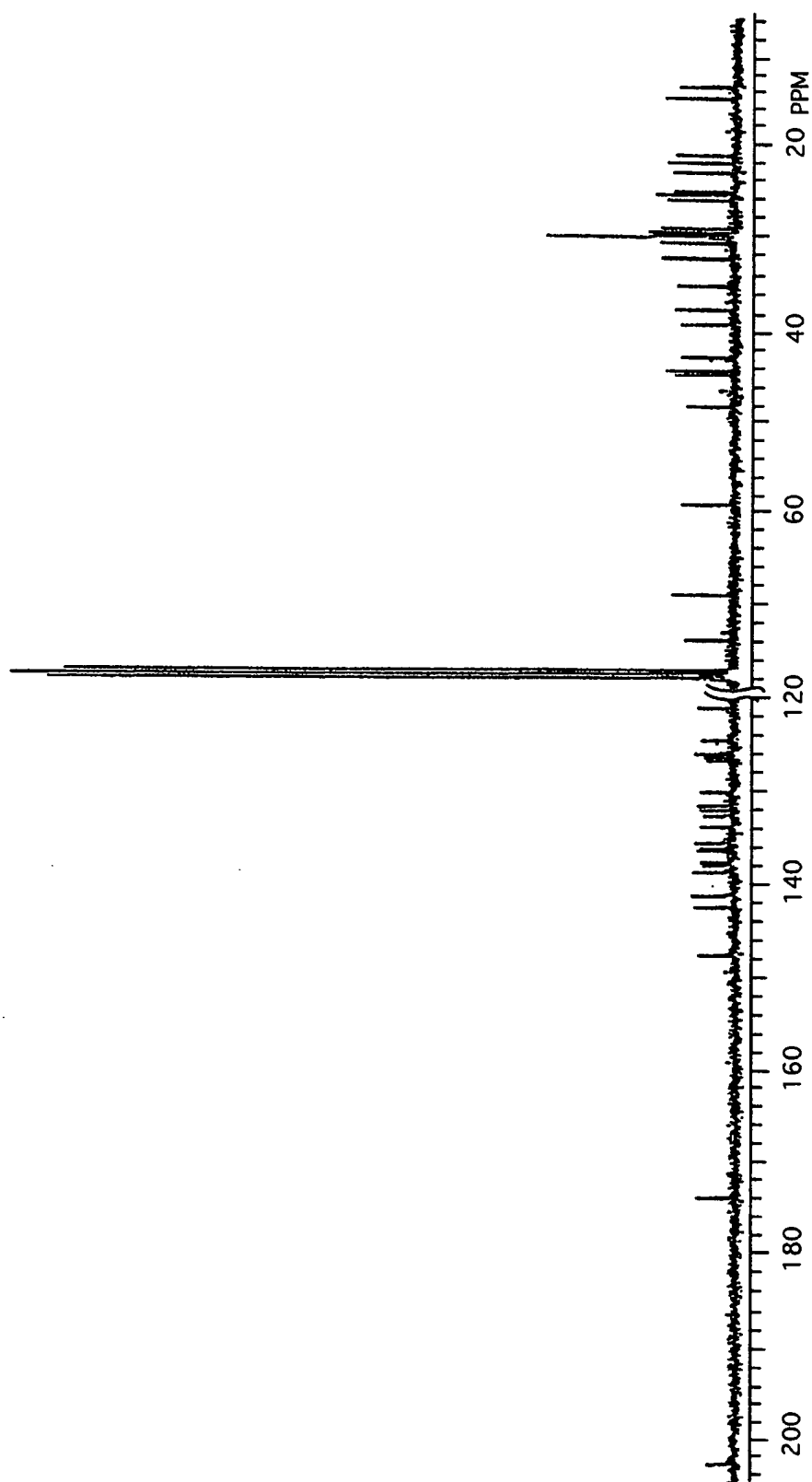
6 / 28

第7図



7 / 28

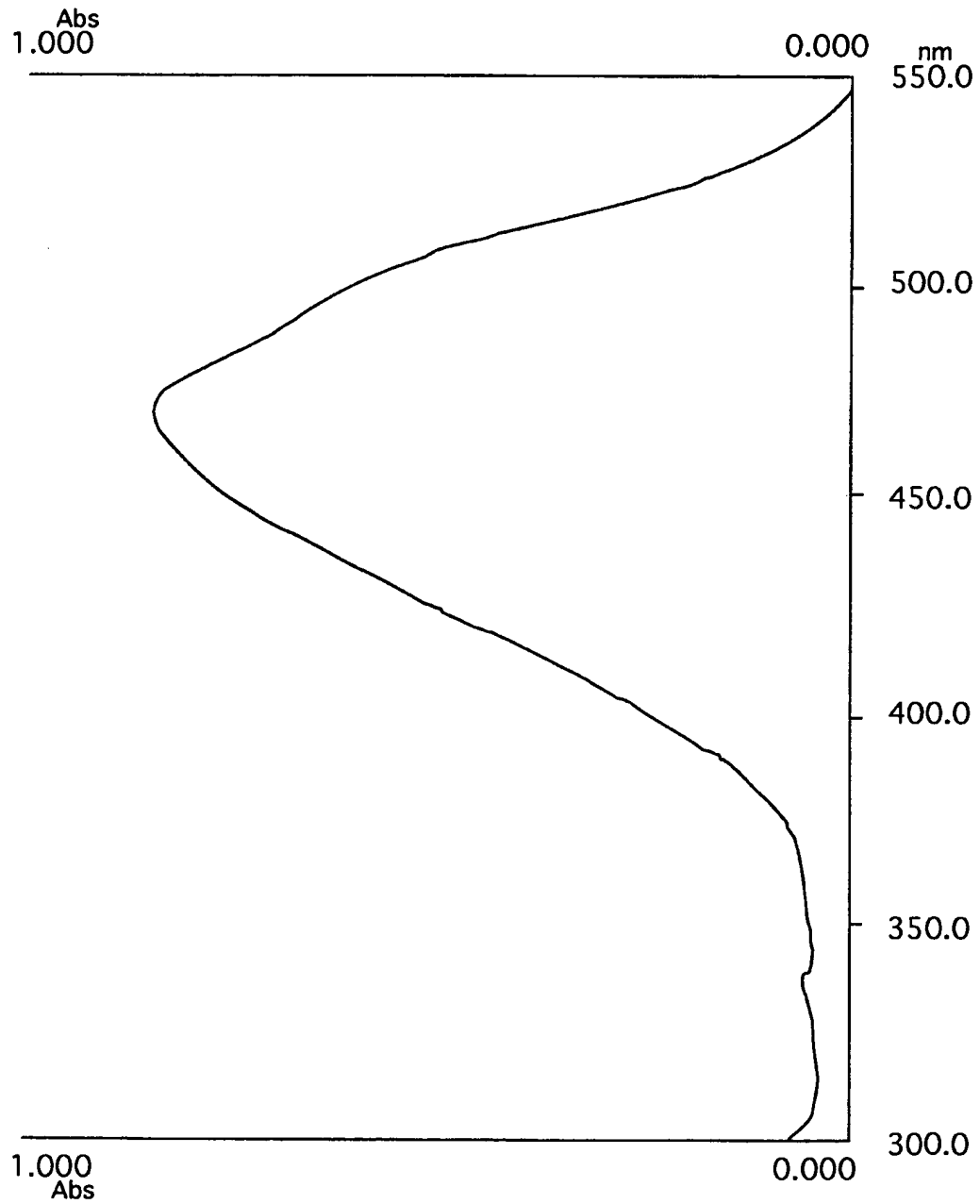
第8図





8 / 2 8

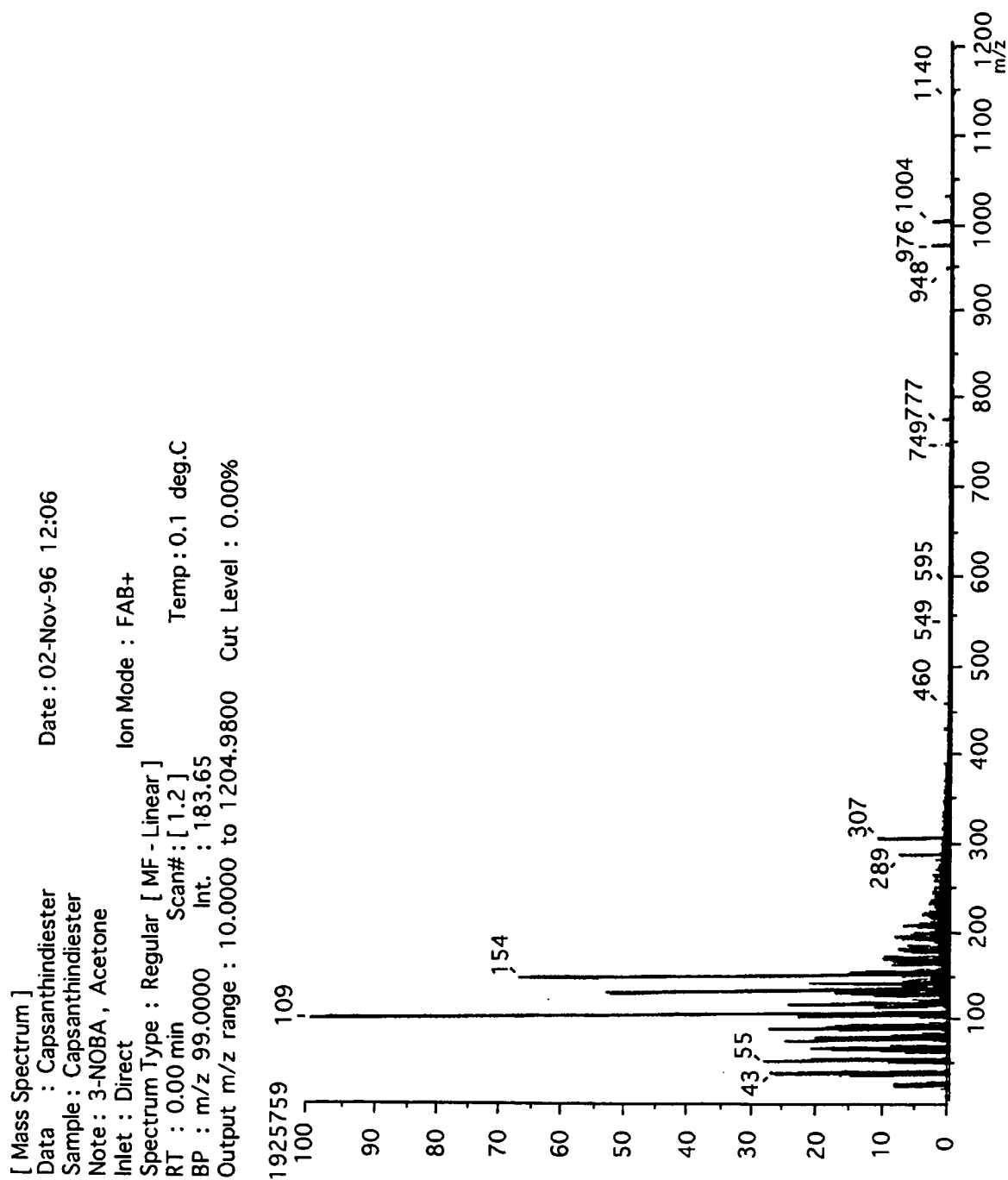
第 9 図



TITLE: 8:56 AM 12/ 9/97  
SCAN SPEED: 800.0 nm/min RESPONSE: MEDIUM  
BANDPASS: 2.00nm

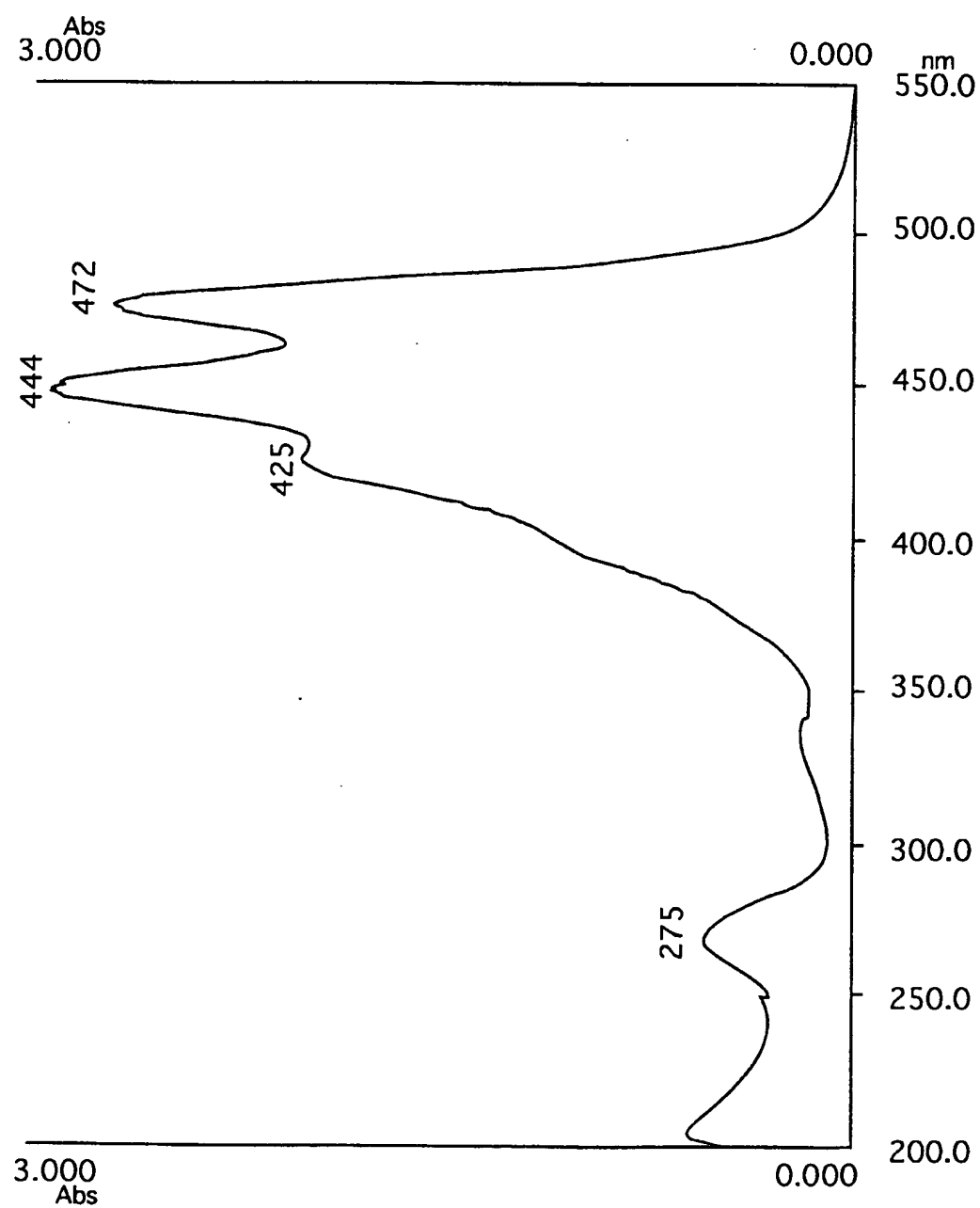
9 / 28

第10図



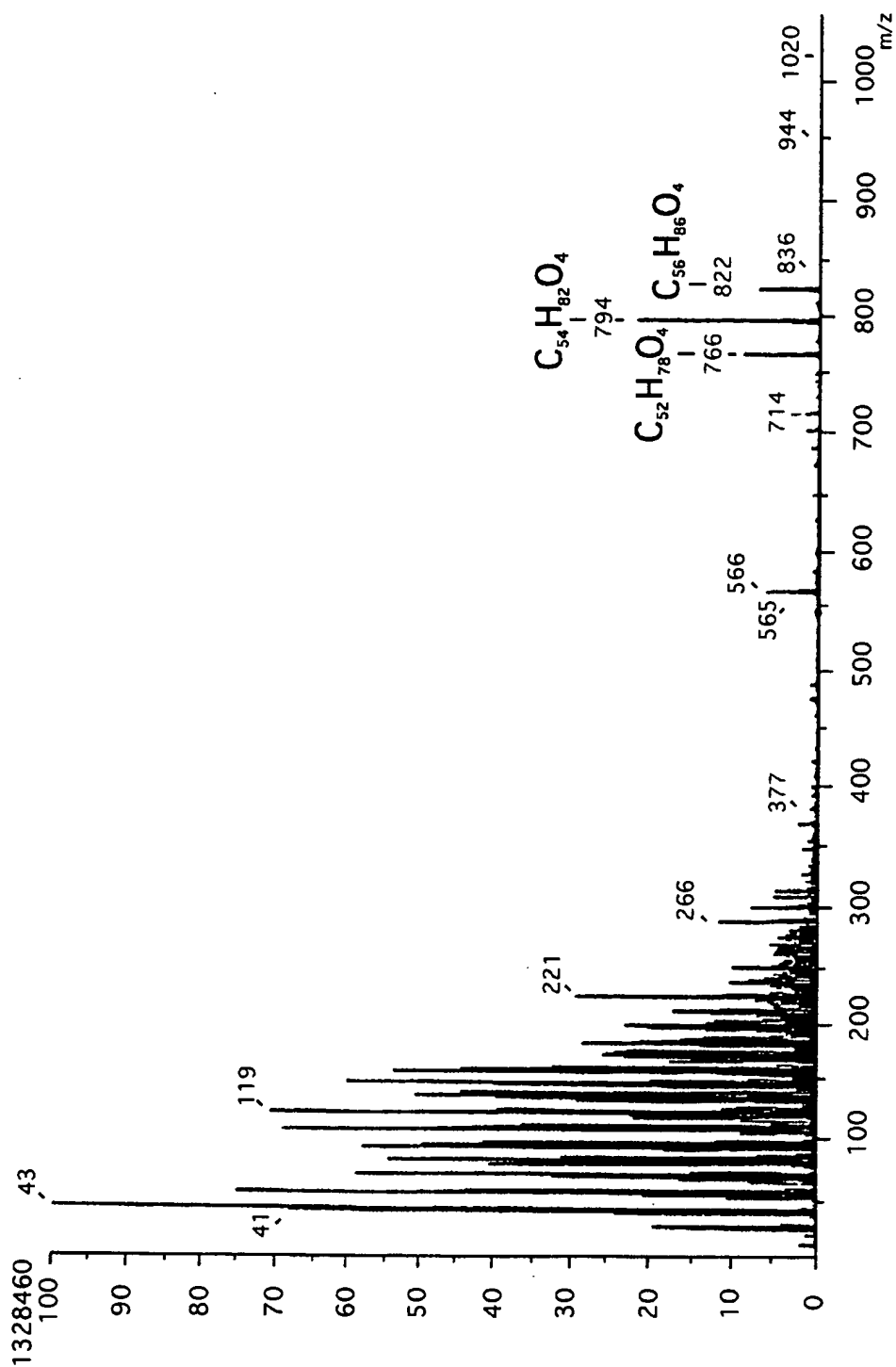


第12図



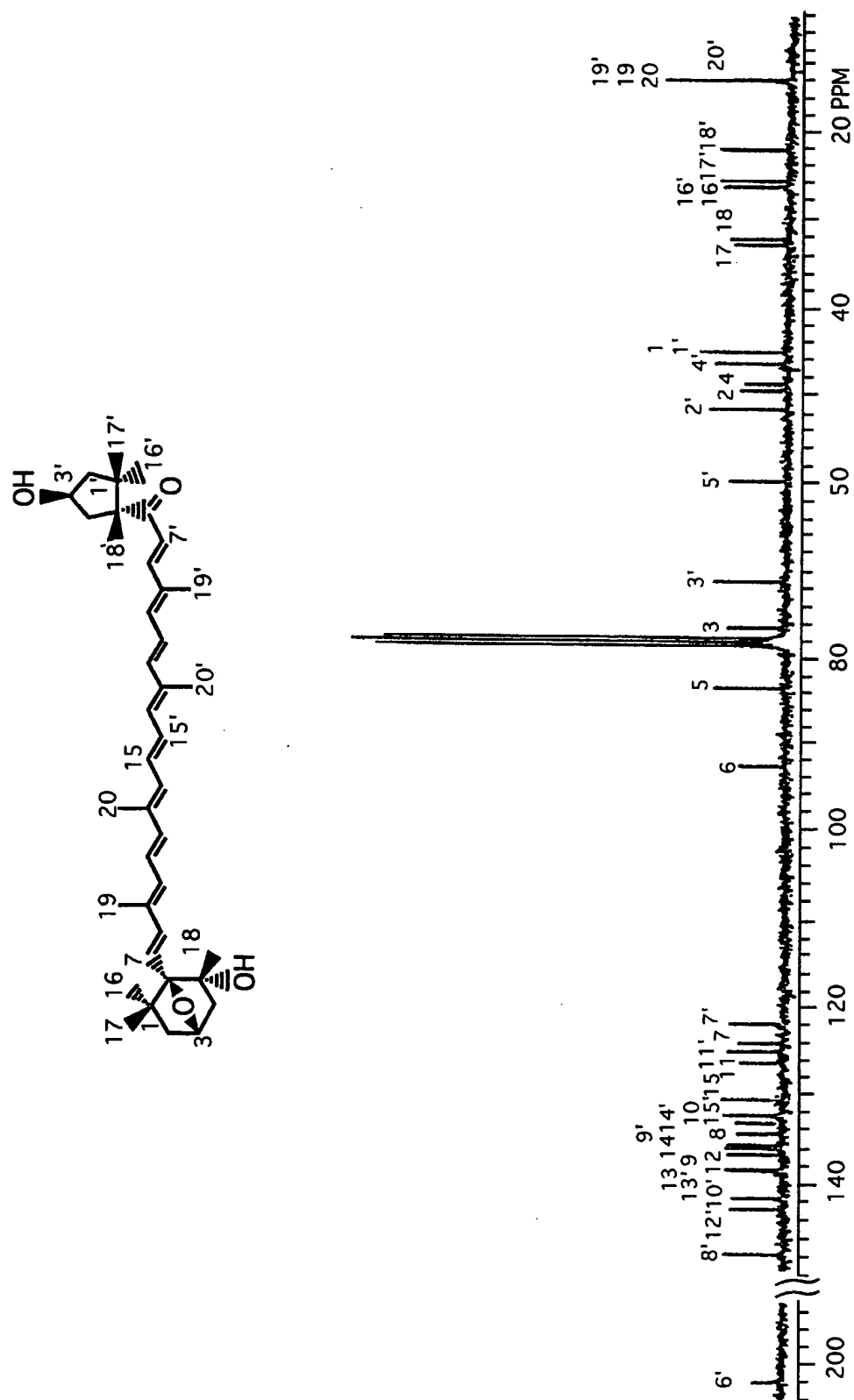
12/28

第13図



13 / 28

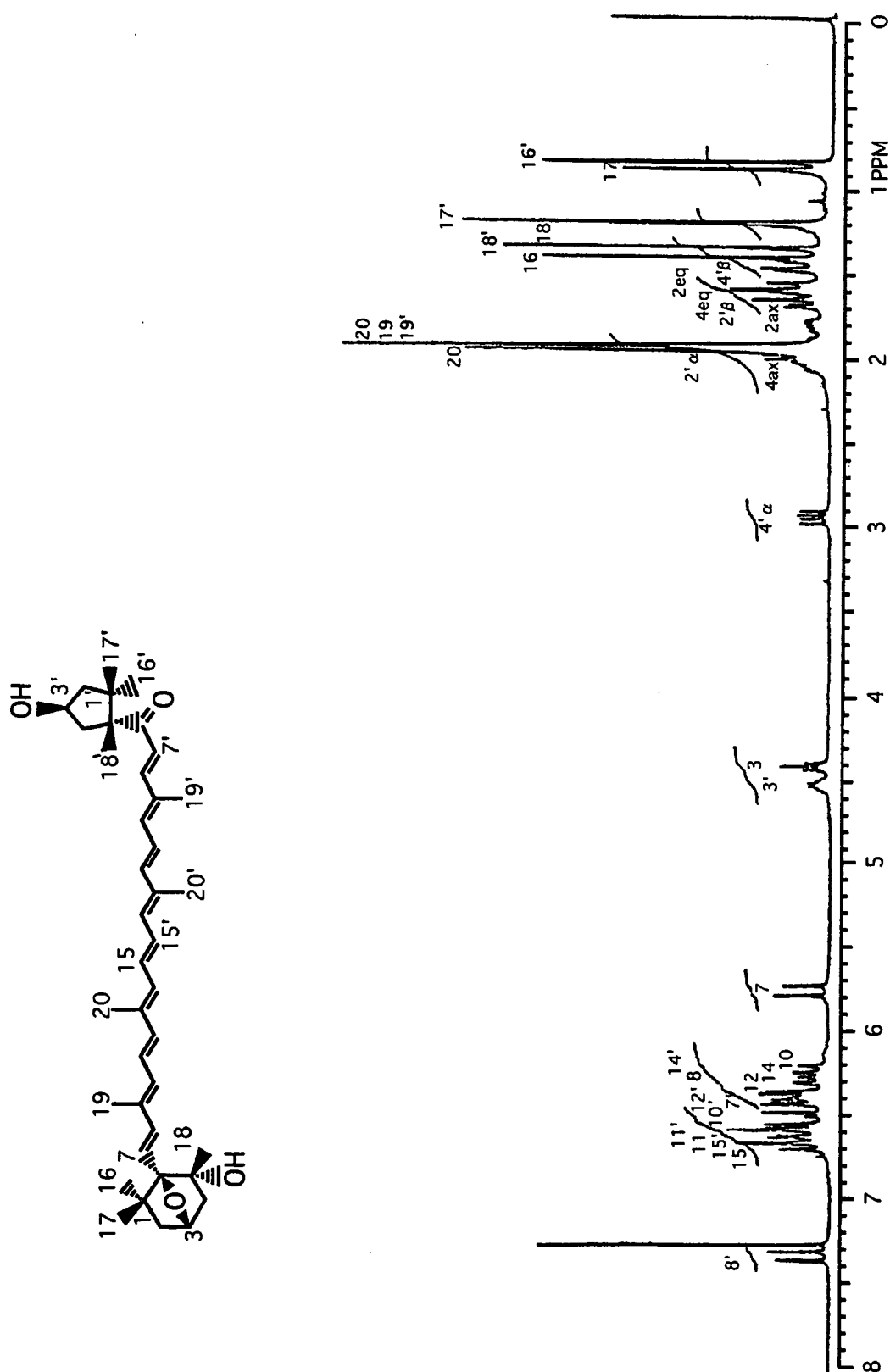
第14図



差替え用紙 (規則26)

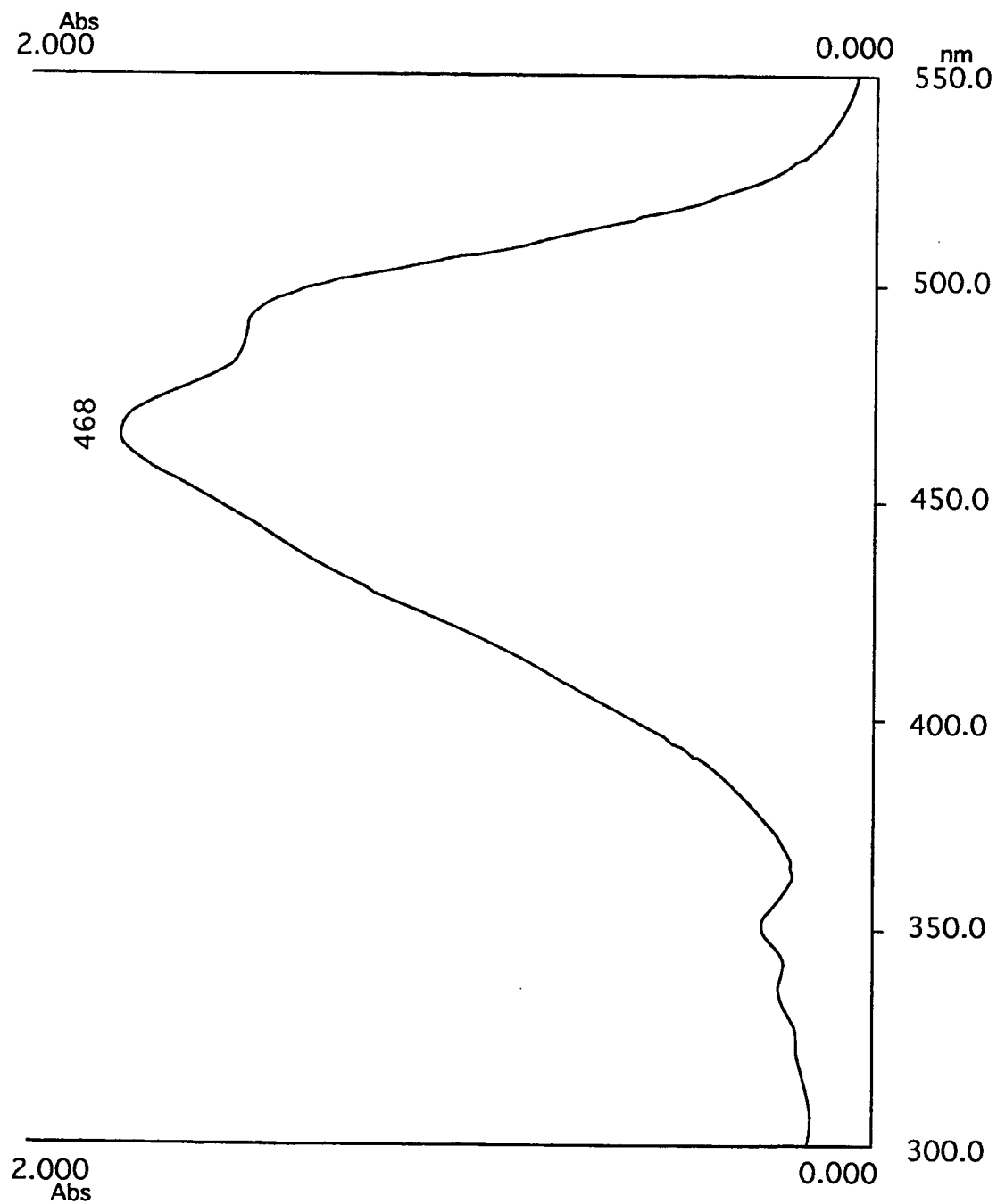
14 / 28

第15図



15 / 28

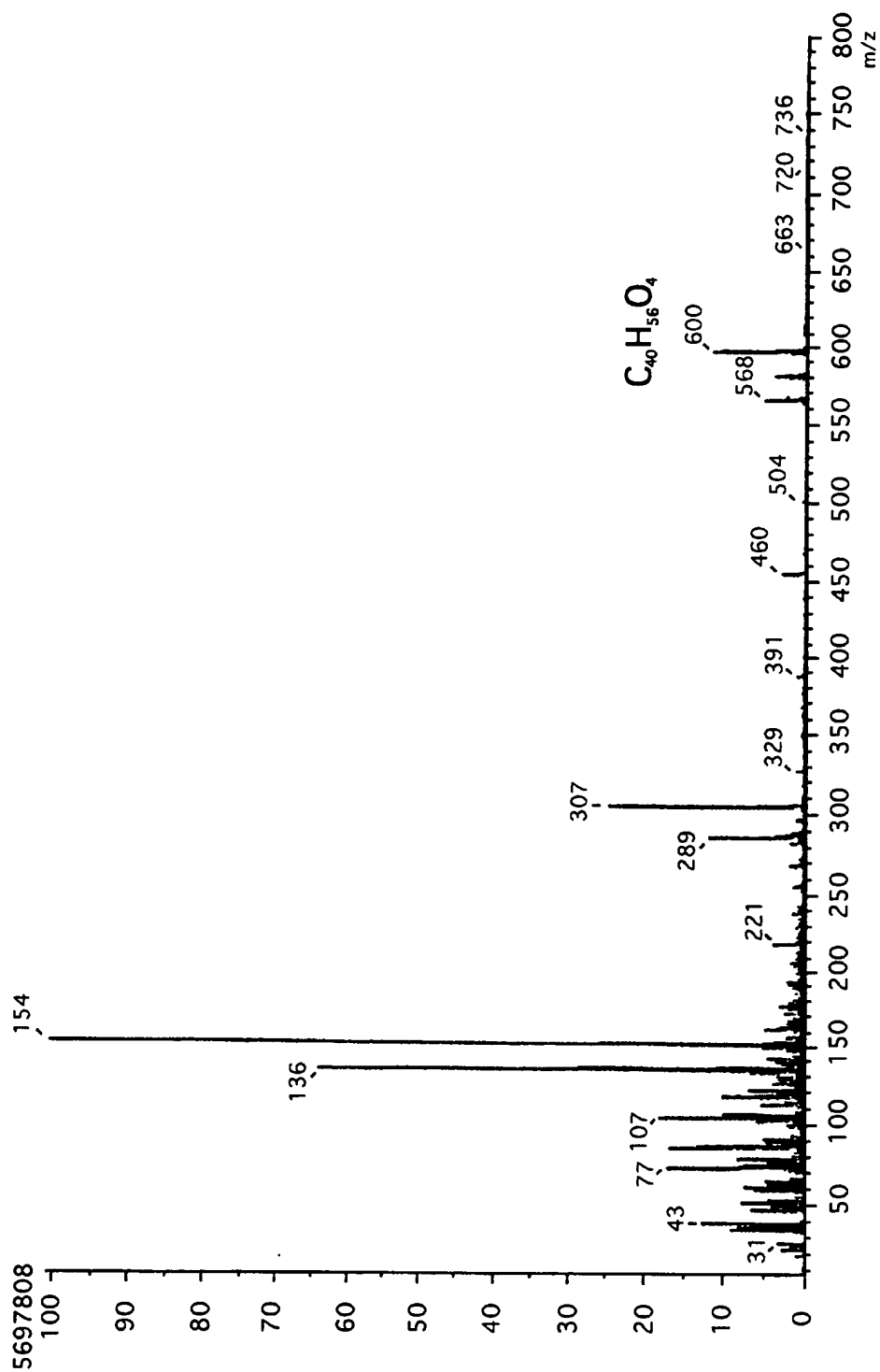
第16図



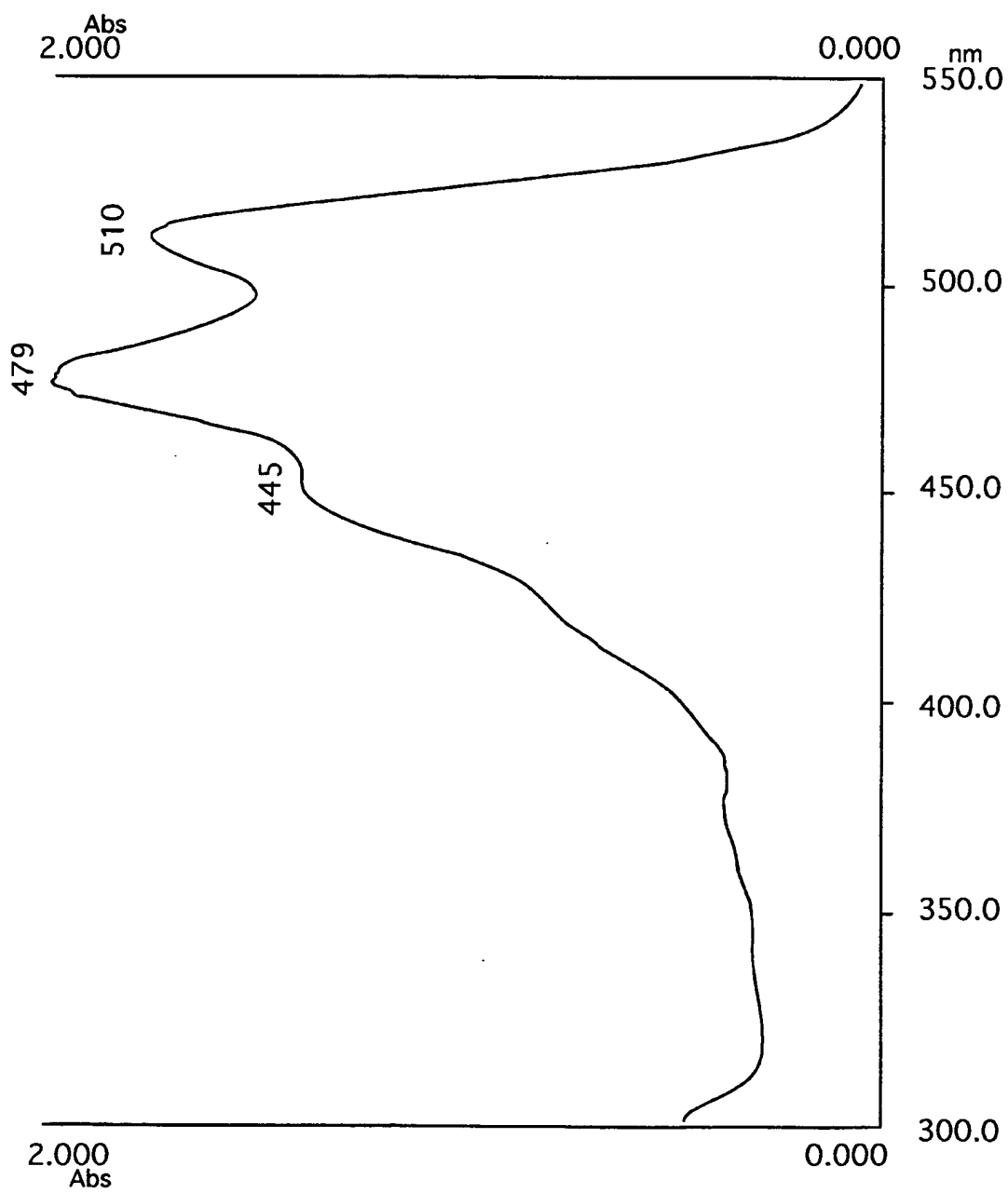


16 / 28

第17図

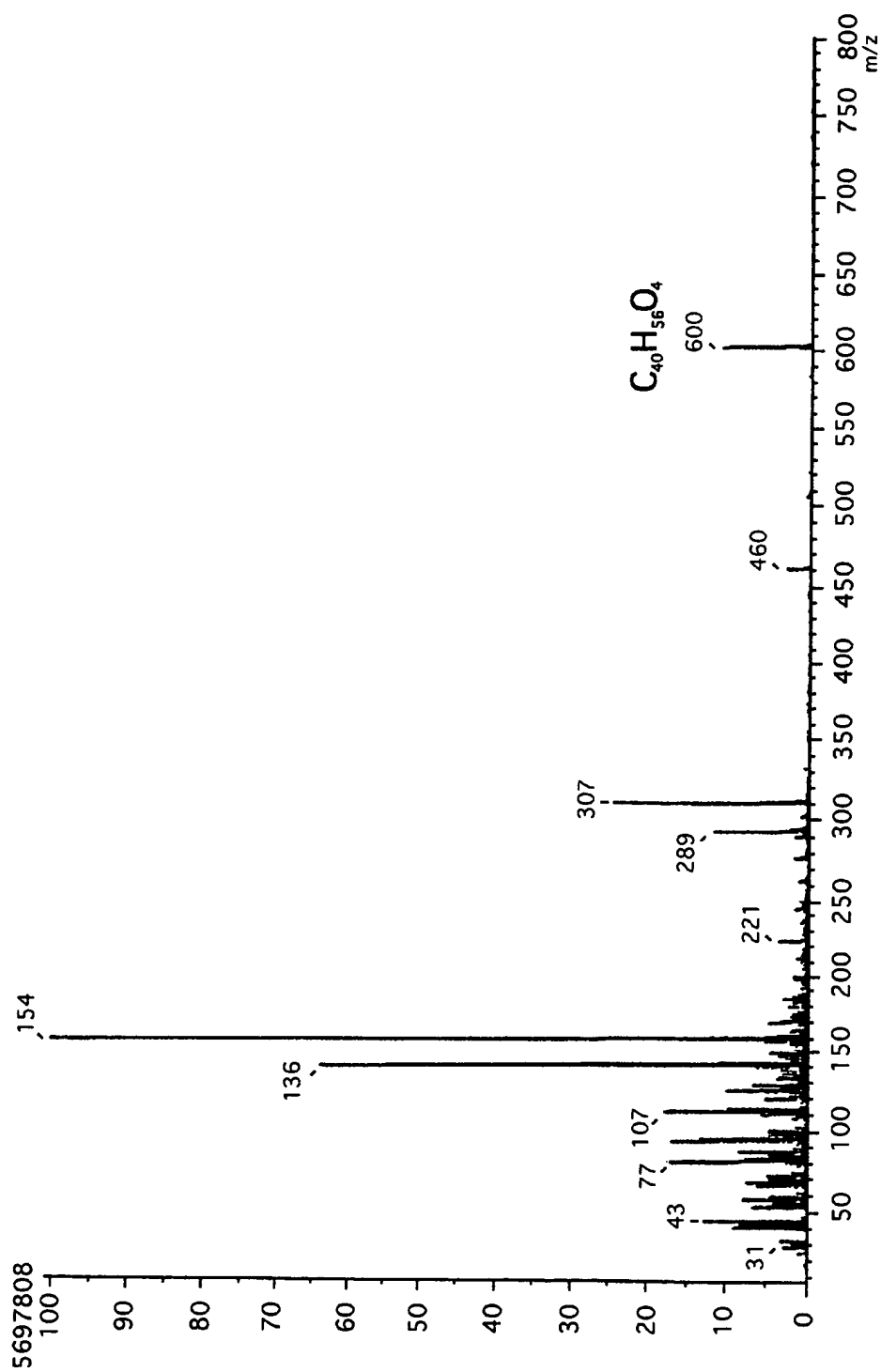






19 / 28

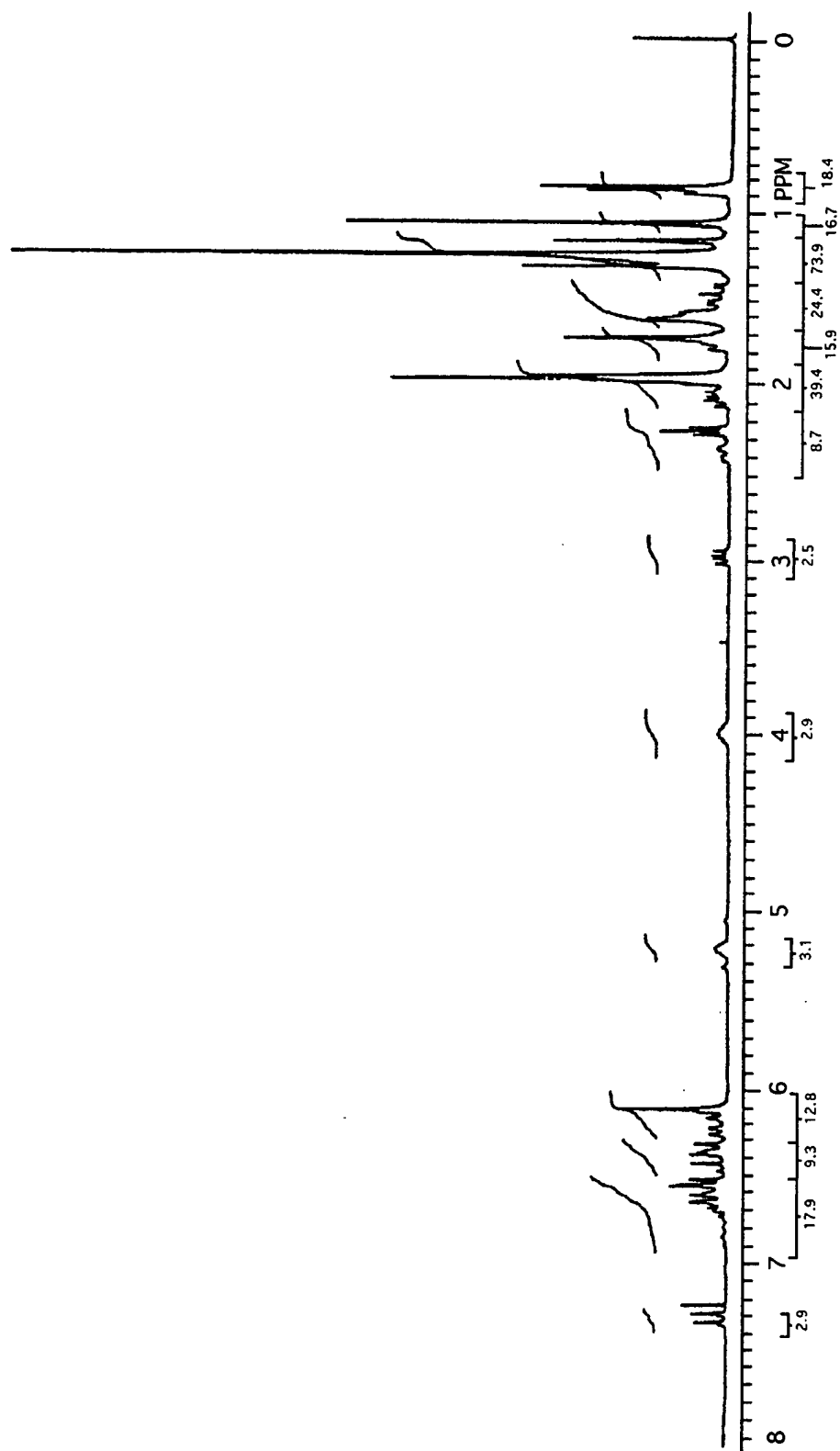
第20図



差替え用紙 (規則26)

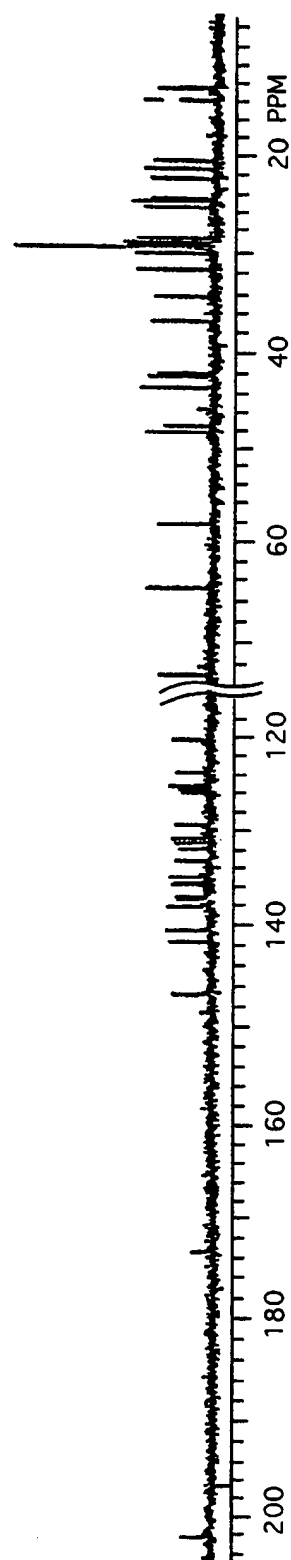
20 / 28

第21図



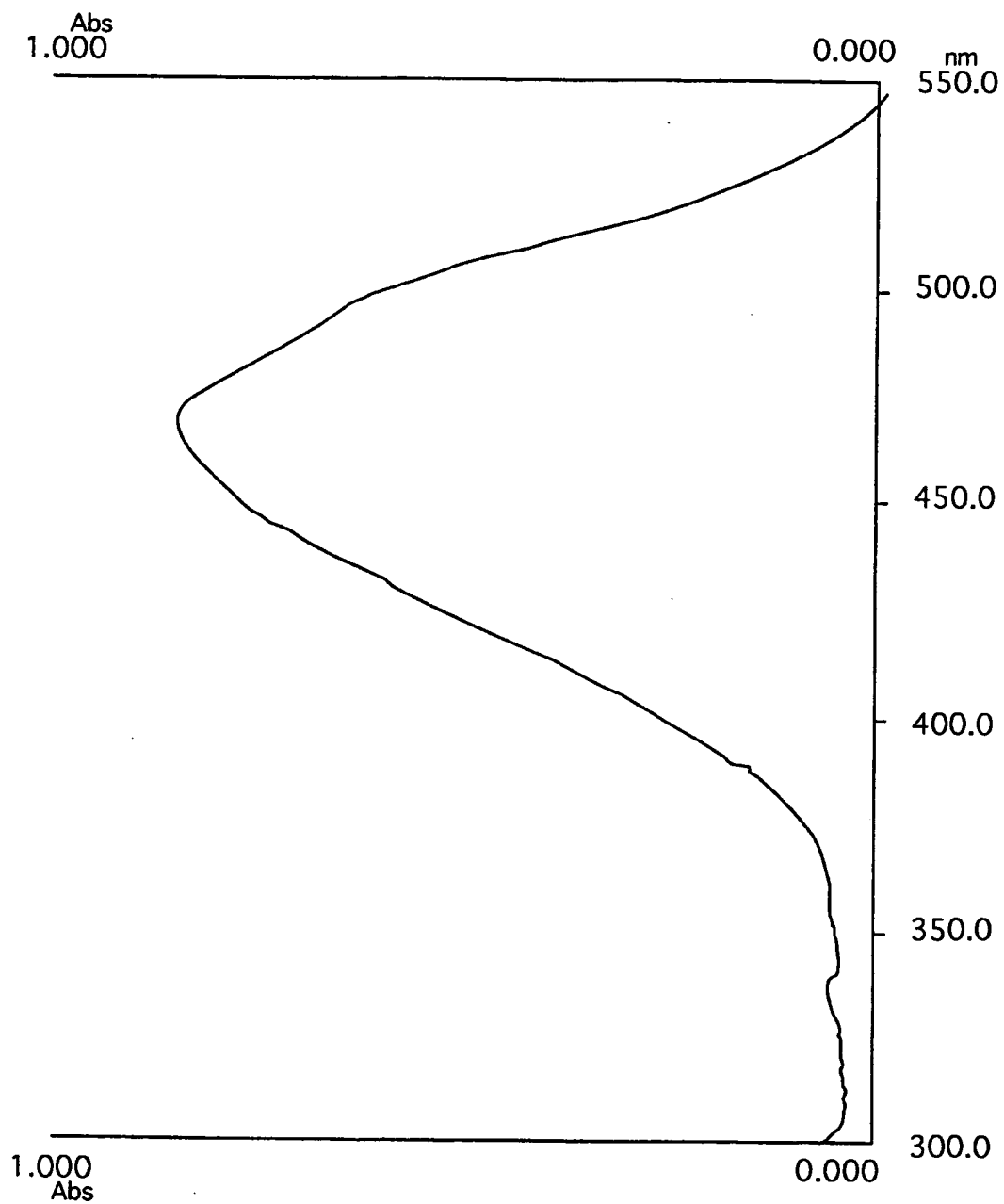
21 / 28

第22図



22 / 28

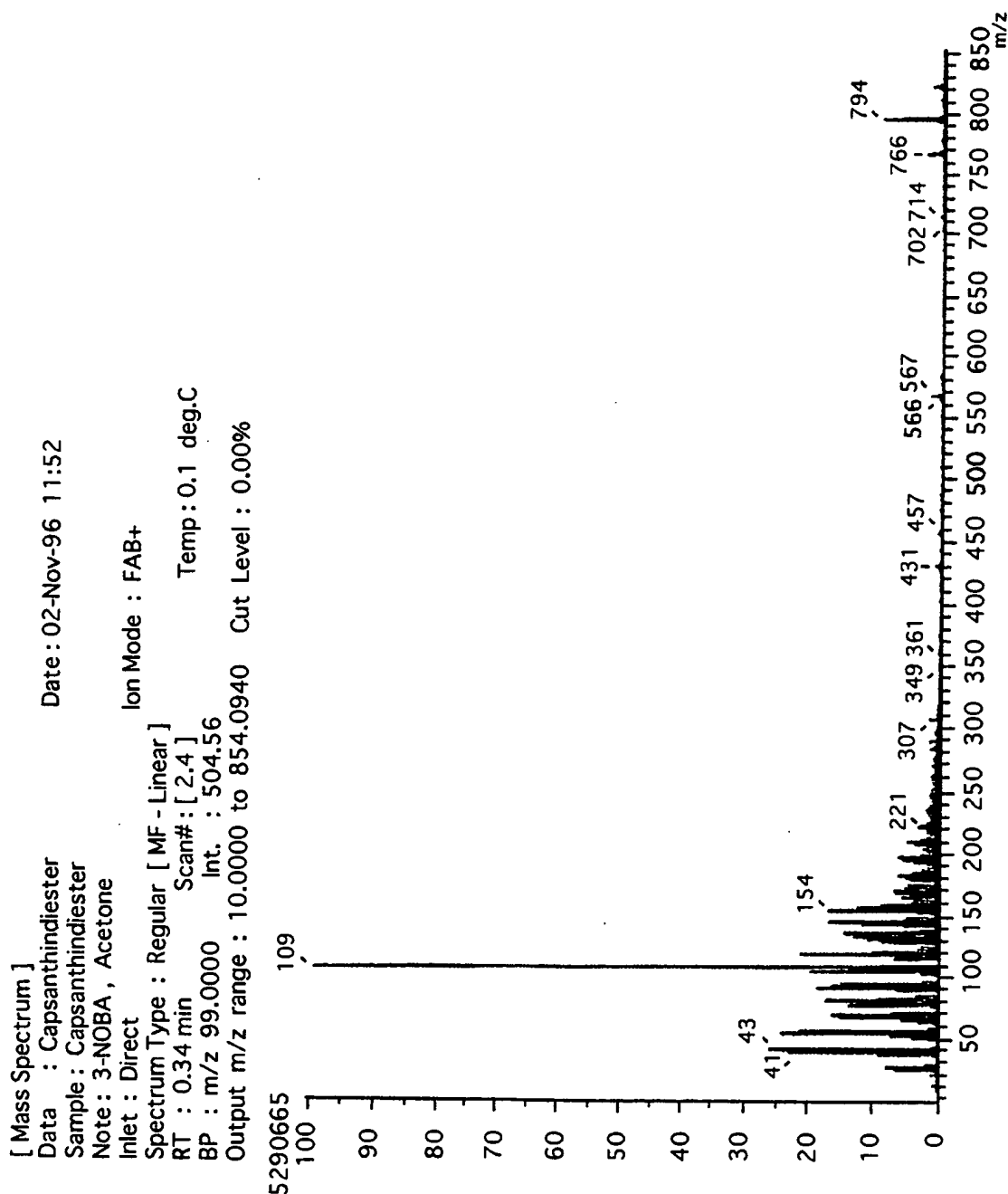
第23図



TITLE: 8:56 AM 12/9/97  
SCAN SPEED: 800.0 nm/min RESPONSE: MEDIUM  
BANDPASS: 2.00nm

23 / 28

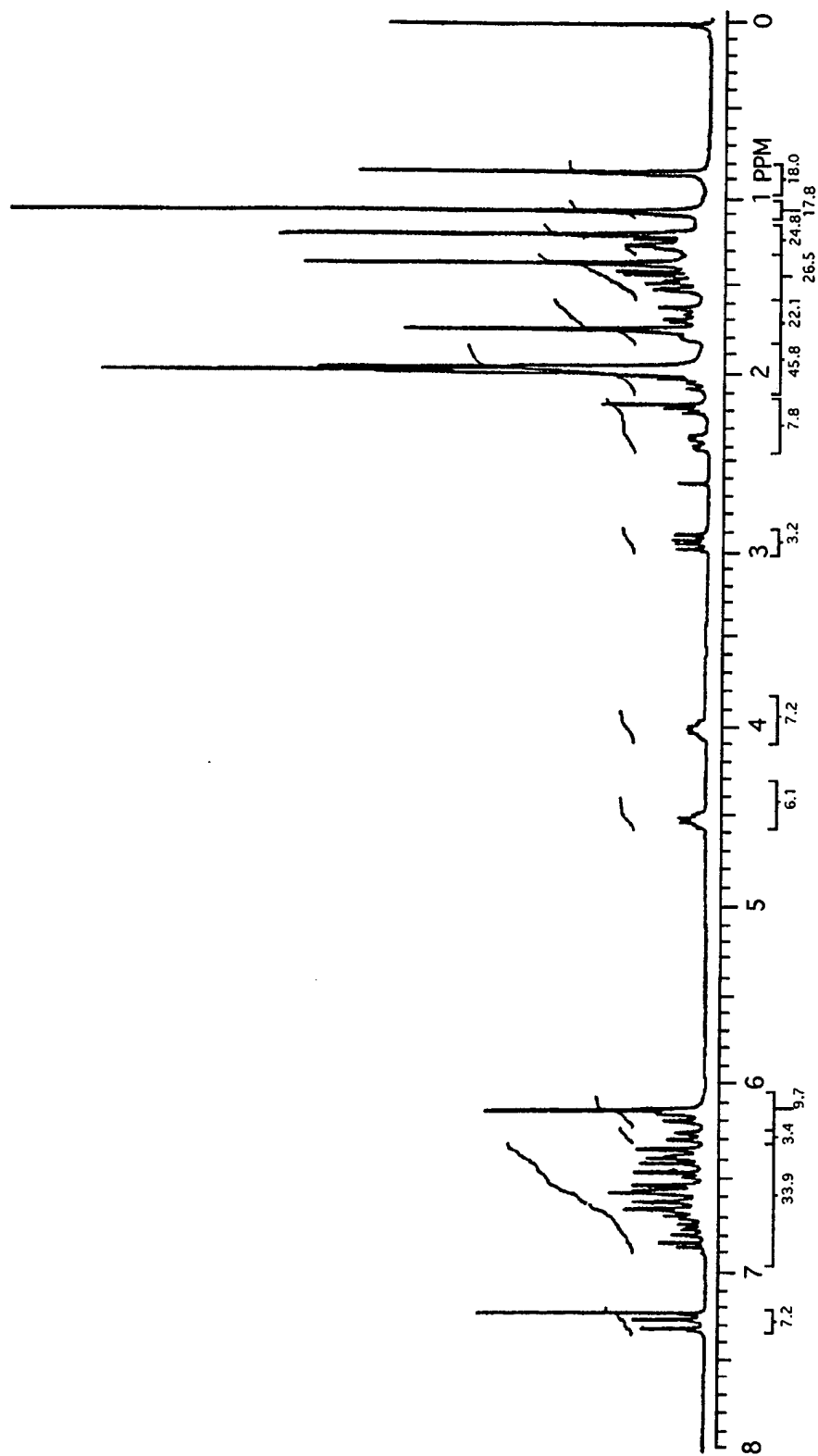
第24図





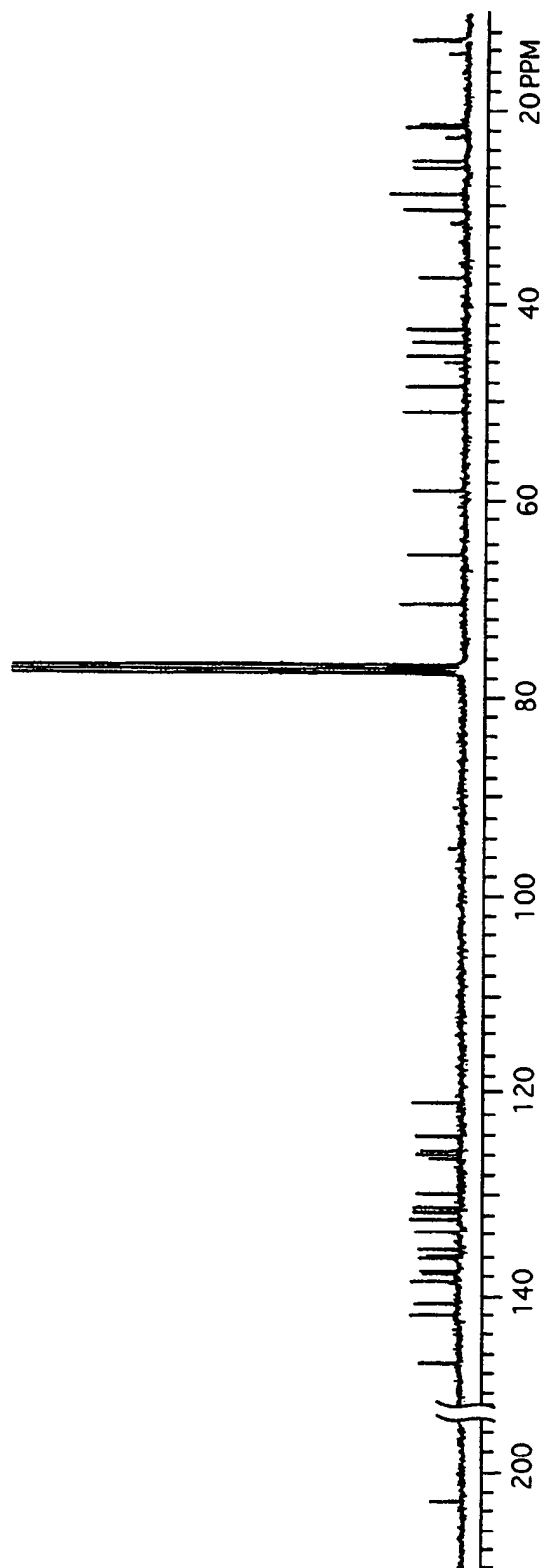
24 / 28

第25図



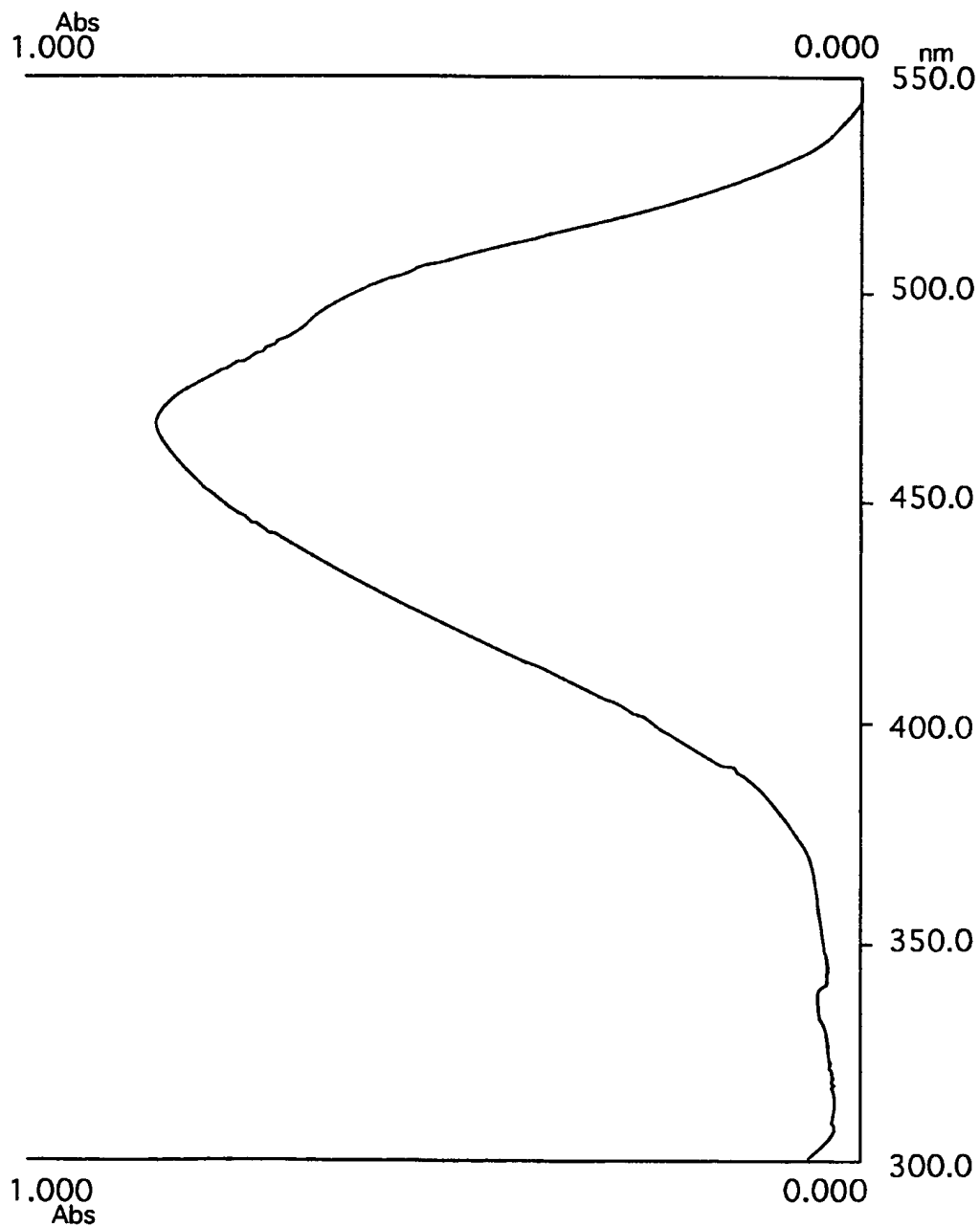
25 / 28

第26図



26 / 28

第27図

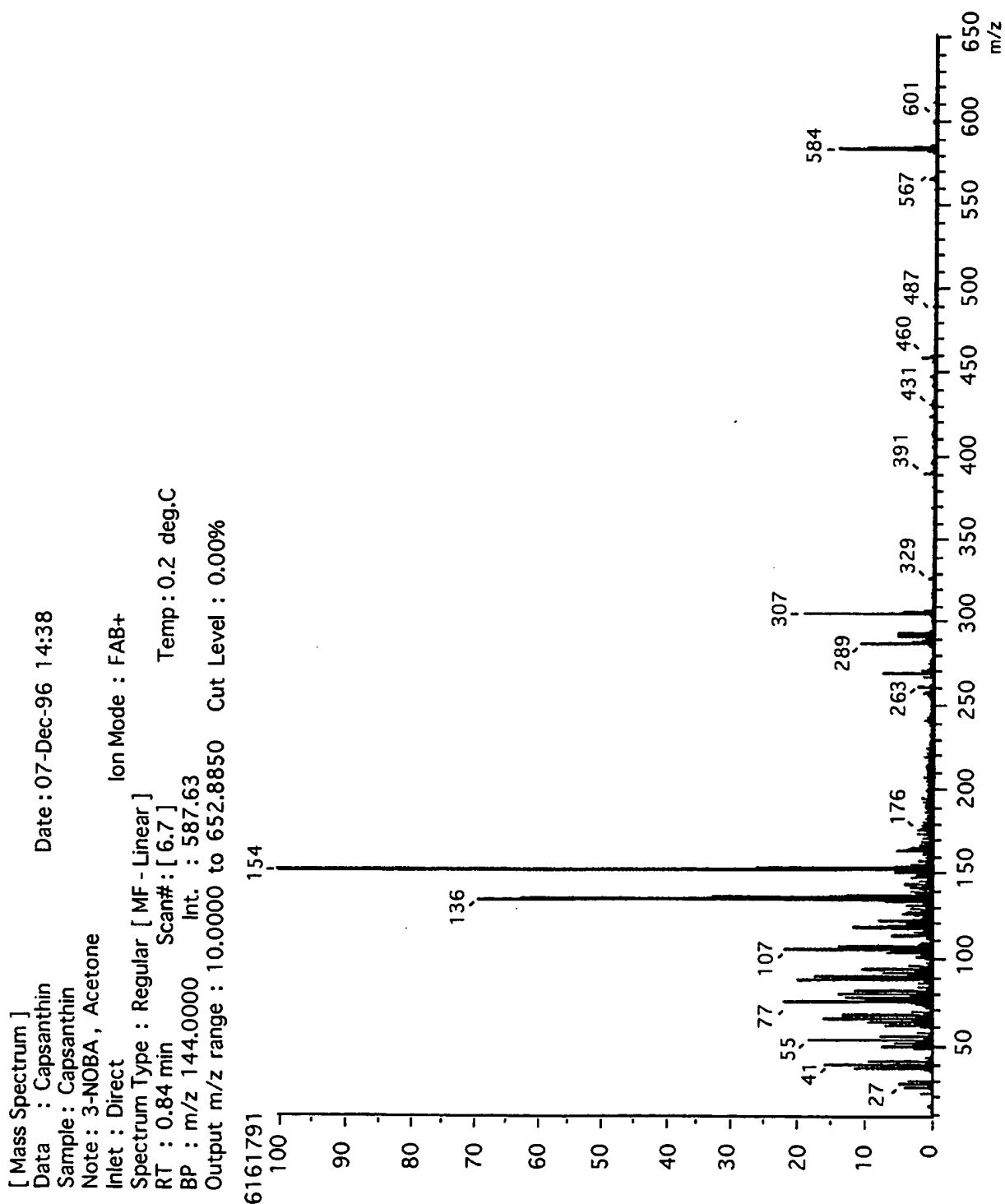


TITLE: 8:56 AM 12/9/97  
SCAN SPEED: 800.0 nm/min RESPONSE: MEDIUM  
BANDPASS: 2.00nm

差替え用紙 (規則26)

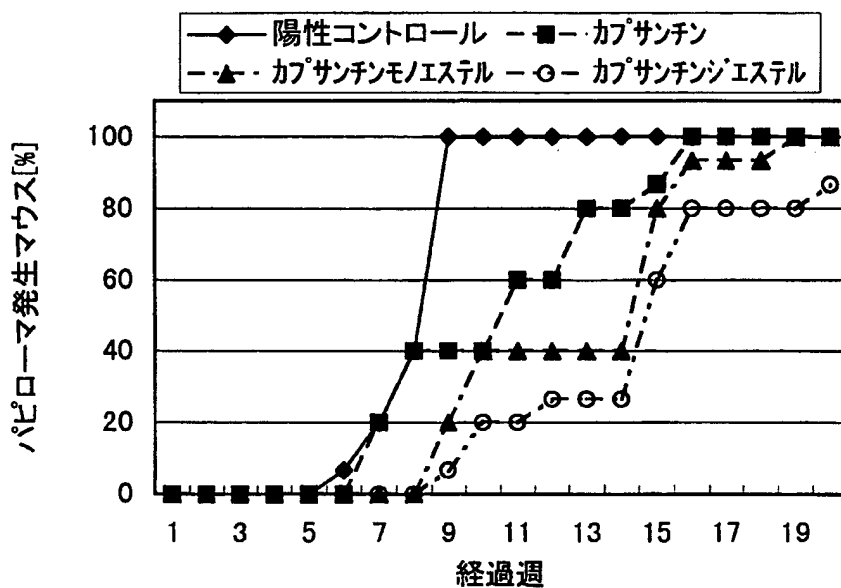
27 / 28

第28図

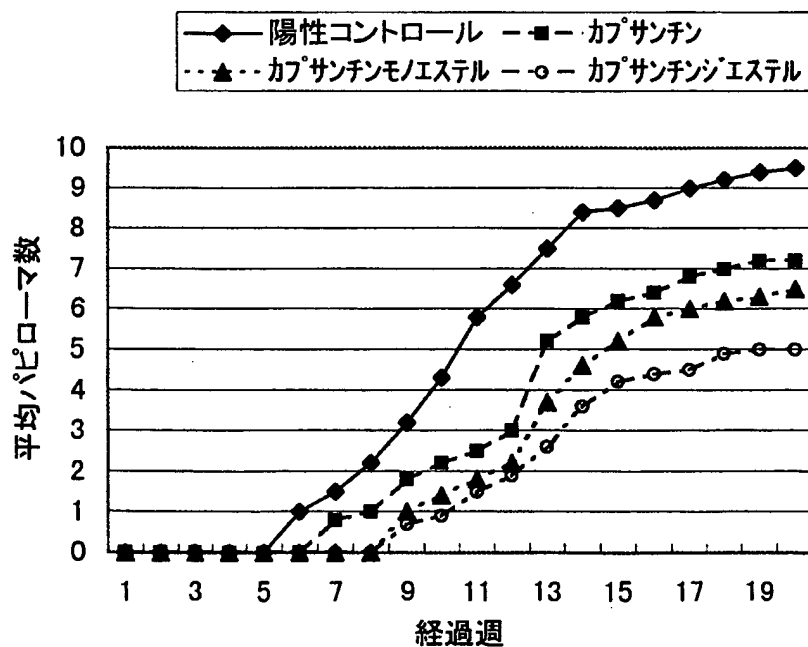


28 / 28

第29図



第30図



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/04765

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> A61K31/12, A61K31/215, A61K31/34, A61K35/78

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> A61K31/12, A61K31/215, A61K31/34, A61K35/78

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/ Y	TSUSHIMA Miyuki, et al., "Inhibitory Effect of Natural Carotenoids on Epstein-Barr Virus Activation Activity of a Tumor Promoter in Raji Cells. A Screening Study for Anti-tumor Promoters." Biol. Pharm. Bull., Vol. 18, No. 2, (1995) p.227-233	1-5, 8-10, 12-13/ 1-19
Y	JÓZEF Deli, et al., "Carotenoid Composition in the Fruits of Black Paprika ( <i>Capsicum annuum</i> Variety <i>longum nigrum</i> ) during Ripening" J. Agric. Food Chem., Vol. 40, No. 11, (1992) p.2072-2076	1-19
Y	JÓZEF Deli, et al., "Carotenoid Composition in the Fruits of <i>Capsicum annuum</i> Cv. Szentesi Kosszarvú during Ripening" J. Agric. Food Chem., Vol. 44, No. 3, (Mar. 1992) p.711-716	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

 Date of the actual completion of the international search  
 March 19, 1998 (19. 03. 98)

 Date of mailing of the international search report  
 March 31, 1998 (31. 03. 98)

 Name and mailing address of the ISA/  
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/04765

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/ Y	KAPADIA Govind J., et al., "Chemoprevention of lung and skin cancer by <i>Beta vulgaris</i> (beet) root extract." Cancer Lettrs, Vol. 100, No. 1, 2, (Feb. 1996) p.211-214, especially, Table. 1	1-5, 10/ 12, 13
P, X	STAHL, Wilhelm., et al., "Biological activities of natural and synthetic carotenoids: induction of gap junctional communication and singlet oxygen quenching" Carcinogenesis, Vol. 18, No. 1, (Jan. 1997) p.89-92	6-7, 11

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> A61K31/12, A61K31/215, A61K31/34, A61K35/78

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> A61K31/12, A61K31/215, A61K31/34, A61K35/78

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/ Y	TSUSHIMA Miyuki, et al., 'Inhibitory Effect of Natural Carotenoids on Epstein-Barr Virus Activation Activity of a Tumor Promoter in Raji Cells. A Screening Study for Anti-tumor Promoters.' Biol. Pharm. Bull., Vol.18, No.2, (1995) p.227-233	1-5, 8-10, 12-13/ 1-19
Y	JÓZEF Deli, et al., 'Carotenoid Composition in the Fruits of Black Paprika ( <i>Capsicum annuum</i> Variety <i>longum nigrum</i> ) during Ripening' J. Agric. Food Chem., Vol.40, No.11, (1992) p.2072-2076	1-19
Y	JÓZEF Deli, et al., 'Carotenoid Composition in the Fruits of <i>Capsicum annuum</i> Cv. Szentesi Kosszarvú during Ripening' J. Agric. Food Chem., Vol.44, No.3, (Mar. 1992) p.711-716	1-19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.03.98

国際調査報告の発送日

31.03.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

弘 實 謙 二

4 C

9 4 5 5

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3454



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X / Y	KAPADIA Govind J., et al., 'Chemoprevention of lung and skin cancer by <i>Beta vulgaris</i> (beet) root extract.' Cancer Lettrs, Vol.100, No.1,2, (Feb. 1996) p.211-214, especially, Table.1	1-5, 10 / 12, 13
P, X	STAHL, Wilhelm., et al., 'Biological activities of natural and synthetic carotenoids: induction of gap junctional communication and singlet oxygen quenching' Carcinogenesis, Vol.18, No.1, (Jan. 1997) p.89-92	6-7, 11